



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102133407 A

(43) 申请公布日 2011.07.27

(21) 申请号 201010621596.9 *A61P 27/02* (2006.01)
(22) 申请日 2003.03.03 *A61P 29/00* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61P 35/00* (2006.01)
60/360831 2002.03.01 US *A61P 43/00* (2006.01)
(62) 分案原申请数据
03809927.6 2003.03.03
(71) 申请人 图兰恩教育基金管理人
地址 美国路易斯安纳州
(72) 发明人 J·A·福塞利尔 D·H·科伊
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 权陆军 李连涛
(51) Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 33 页
序列表 17 页 附图 2 页

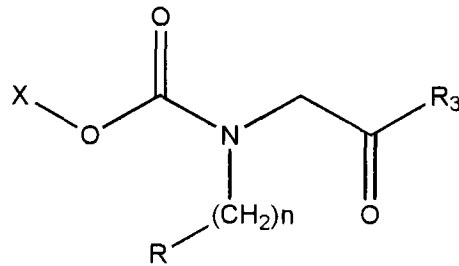
(54) 发明名称

治疗剂或细胞毒性剂与生物活性肽的偶联物

(57) 摘要

本发明涉及治疗剂或细胞毒性剂与生物活性肽的偶联物。具体地,本发明涉及治疗剂或细胞毒性剂与靶向部分的偶联化合物、包含所述化合物的药物以及所述化合物的用途。

1. 一种由下式表示的化合物：



其中：

X 是细胞毒性剂或治疗剂；

n 是 0-6 的整数，其中 $(\text{CH}_2)_n$ 是烷基或环基基团；

R 是 $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$ 、 OR_1 或 SR_1 ，其中 R_1 和 R_2 相互独立地是氢或直链或支链的含有少于 11 个碳原子的低级烷基，且其中 R_3 是 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SH}$ 基团和 $m = 2-6$ 、D 或 L 半胱氨酸、二苯甲酮或 OH 基团，或是 NH-Y-Z-Q ；

Y 是亲水性间隔序列，或者缺失；

Z 是具有如下通式的连接肽：

A-B-C-E-F，其中：

A 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser 或 L-Ser，或者缺失；

B 是 D-Lys 或 D-Tyr，或者缺失；

C 是 Lys、Ser、hSer、Thr、Nle、Abu、Nva、(2-、3- 或 4-) 吡啶基 -Ala (Pal)、Orn、Dab、Dap、4-NH₂-Phe、D-4-OH-Pro 或 L-4-OH-Pro，或者缺失；

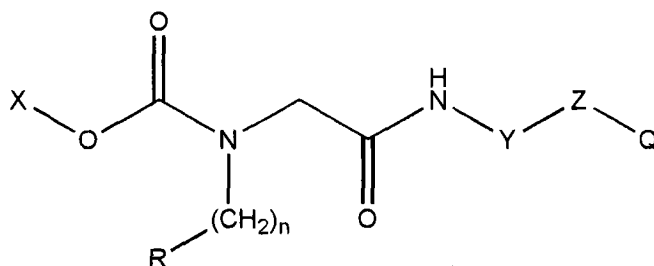
E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3- 碘 -D-Tyr、3-5 二碘 -D-Tyr、3- 碲 -D-Tyr、3-5 碲 -D-Tyr、3- 溴 -D-Tyr、3-5 二溴 -D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln；和

F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3- 碘 -D-Tyr、3-5 二碘 -D-Tyr、3- 碲 -D-Tyr、3-5 碲 -D-Tyr、3- 溴 -D-Tyr、3-5- 二溴 -D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln；

条件是当 A、B、C 和 E 分别是 Tyr、Tyr、Lys 和 Tyr 时，则 F 不是 Lys；当 A、B、C 和 E 分别是 Lys、Tyr、Lys 和 Tyr 时，则 F 不是 Tyr 或 Lys；当 A 和 B 缺失，且 C 和 E 分别是 Lys 和 Tyr 时，则 F 不是 Tyr 或 Lys；和

Q 为靶向部分。

2. 根据权利要求 1 的化合物，其中 R_3 是 NH-Y-Z-Q 且所述化合物是由下式表示的偶联化合物：



3. 根据权利要求 1 或 2 的化合物，其中 X 是细胞毒性剂。

4. 根据权利要求 3 的化合物,其中 X 是烷基化剂、抗生素、抗代谢物、微管蛋白抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、激素激动剂或拮抗剂、凋亡剂、或免疫调制剂。

5. 根据权利要求 3 的化合物,其中 X 是:喜树碱、同型喜树碱、秋水仙碱、硫秋水仙碱、combretastatin、dolistatin、阿霉素、氨甲蝶呤、鬼臼毒素、华根毒素、华根毒素 D、紫杉醇(taxol)、紫杉醇(paclitaxel)、CC1065 或美登素。

6. 根据权利要求 2 的化合物,其中 Y 选自增加所述化合物的亲水性生物分布的肽和亲水性聚合物。

7. 根据权利要求 6 的化合物,其中所述亲水性间隔序列是增加所述化合物的亲水性生物分布的肽。

8. 根据权利要求 7 的化合物,其中所述肽具有通式 $U(V-V)_n$,其中:

U 是 D-Pro、L-Pro、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、肌氨酸、Lys、Orn、Dab、Dap、4-NH₂-Phe 或者 (NH₂-(CH₂)_m-COOH),其中 m = 2-10,包括两端值,或者缺失;每一个 V 独立地选自:D-Ser、L-Ser、D-Thr、L-Thr、D-Gln、L-Gln、D-Asn、L-Asn、D-4-OH-Pro 或者 L-4 羟基-Pro;和 n = 1-50,包括两端值。

9. 根据权利要求 8 的化合物,其中至少一个 V 是 D-氨基酸。

10. 根据权利要求 8 的化合物,其中 V 独立地为 D-Ser 或 L-Ser。

11. 根据权利要求 6 的化合物,其中所述亲水性间隔序列是亲水性聚合物。

12. 根据权利要求 11 的化合物,其中所述亲水性聚合物是聚乙二醇、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、HPMA(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)或 HPMA 共聚物、 α , β -聚(N-羟乙基)-DL-天冬酰胺(PHEA)或 α , β -聚(N-羟丙基)-DL-天冬酰胺。

13. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中所述靶向部分是生物活性肽。

14. 根据权利要求 13 的化合物,其中所述靶向部分将所述化合物靶向到哺乳动物体内的细胞或组织。

15. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中所述靶向部分是来自噬菌体展示文库的肽或其保守性取代,其将所述化合物靶向到哺乳动物体内的细胞或组织。

16. 根据权利要求 14 或 15 的化合物,其中所述细胞或组织包括癌症细胞、白细胞、心脏组织、脑组织或结核感染的结节,或者其中所述组织是肿瘤或增殖性血管源血管。

17. 根据权利要求 16 的化合物,其中所述血管位于眼中。

18. 根据权利要求 13 的化合物,其中所述生物活性肽是促生长素抑制素、铃蟾肽、KiSS 肽、硬骨鱼紧张肽 II 肽、促性腺激素释放激素(GnRH) I 和 II 肽、奥曲肽、depreotide、vapreotide、血管活性肠肽(VIP)、缩胆囊素(CCK)、胰岛素样生长因子(IGF)、含 RGD 肽、黑素细胞刺激激素(MSH)肽、神经降压素、降钙素、含有抗肿瘤抗体的互补决定区的肽、谷胱甘肽、包含氨基酸序列 YIGSR、血小板因子-4(PF-4)的肝素结合区和富含赖氨酸序列的白细胞亲合肽、心房利钠肽(ANP)、 β -淀粉样肽、 δ -阿片拮抗剂、膜联蛋白-V、内皮素、白细胞介素(IL)-1、IL-1ra、IL-2、IL-8、白三烯 B4(LTB4)、趋化肽、GP IIb/IIIa 受体拮抗肽、表皮生长因子、人嗜中性弹性蛋白酶抑制剂、血浆酶抑制剂、抗菌肽、apticide P280、apticide P274、血小板反应蛋白受体、bitistatin、I 型垂体腺苷酰环化酶受体(PAC1)、纤维蛋白 α -链、或它们的衍生物或类似物、抗体或抗体片段。

19. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述白细胞亲合肽是 P483H。

20. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述 δ -阿片拮抗剂是 ITIPP(ψ)。
21. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述趋化肽是 N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯基丙氨酸-赖氨酸 (fMLFK)。
22. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述 GP IIb/IIIa 受体拮抗肽是 DMP444。
23. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述人嗜中性弹性蛋白酶抑制剂是 EPI-HNE-2 和 EPI-HNE-4。
24. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述血小板反应蛋白受体是 TP-1300。
25. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中 Q 是促生长素抑制素肽或其类似物。
26. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中 Q 是铃蟾肽或其类似物。
27. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中 Q 是血管活性肠肽 (VIP) 或其类似物。
28. 根据权利要求 18 的化合物,其中所述抗体是单克隆抗体或其片段。
29. 根据权利要求 2 的化合物,其中 Z 是 D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser, D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser, D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr, D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser, D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser, D-Ser-Ser-D-Lys-Ser, D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser, D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser, D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser, Lys-D-Ser-D-Ser, Ser-D-Lys-D-Ser, Ser-D-Lys-Ser, Nle-D-Tyr-D-Ser, Lys-D-Tyr-D-Ser, Pal-D-Lys-D-Ser, Thr-D-Tyr-D-Ser, D-Ser-D-Lys, D-Ser-D-Tyr, D-Lys-D-Lys, D-Lys-D-Tyr, D-Tyr-D-Lys, 或者其中 Z 具有下述通式:
E-F, 其中:
E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5 二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5 碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5 二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Gln 或 L-Gln; 和
F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5 二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5 碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5 二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln。
30. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中 R_1 或 R_2 包括 1 至 8 个碳原子。
31. 根据权利要求 1 或 2 的化合物,其中 $n = 2$ 或 3。
32. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_3 基团用于将肽、蛋白质或抗体连接到所述化合物上。
33. 根据权利要求 32 的化合物,其中 R_3 是 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SH}$ 和 $m = 2-6$, 和其中所述肽、蛋白质或抗体是通过硫醇反应而连接到所述化合物上。
34. 根据权利要求 32 的化合物,其中 R_3 是二苯甲酮和所述肽、蛋白质或抗体是通过光化学反应而连接到所述化合物上。
35. 根据权利要求 34 的化合物,其中所述二苯甲酮是对苯甲酰基-苯丙氨酸。
36. 用于治疗疾病的药物,其包含治疗有效量的权利要求 2-31 之任一项的化合物和药物可接受载体、赋形剂或盐。
37. 根据权利要求 36 的药物,其中所述疾病是:炎性肠道疾病、类风湿性关节炎、肢端肥大症、结核、肺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤、眼肿瘤、前列腺肿瘤或结肠肿瘤;神经内分泌起源的肿瘤;或导致血管异常增殖的血管发生病。

38. 根据权利要求 37 的药物,其中所述神经内分泌起源的肿瘤是类癌瘤综合症。
39. 根据权利要求 37 的药物,其中所述血管位于眼中。
40. 根据权利要求 37 的药物,其中所述血管发生病是视网膜黄斑病变或糖尿病性视网膜病。
41. 根据权利要求 2-31 之任一项的化合物在制备用于治疗下述疾病的药物中的应用:炎性肠道疾病、类风湿性关节炎、肢端肥大症、结核、肺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤、眼肿瘤、前列腺肿瘤或结肠肿瘤;神经内分泌起源的肿瘤;或导致血管异常增殖的血管发生病。
42. 根据权利要求 41 的应用,其中所述神经内分泌起源的肿瘤是类癌瘤综合症。
43. 根据权利要求 41 的应用,其中所述血管位于眼中。
44. 根据权利要求 41 的应用,其中所述血管发生病是视网膜黄斑病变或糖尿病性视网膜病。

治疗剂或细胞毒性剂与生物活性肽的偶联物

[0001] 本申请是国际申请日为 2003 年 3 月 3 日的国际申请 PCT/US2003/006657 进入中国、申请号为 03809927.6 的题为“治疗剂或细胞毒性剂与生物活性肽的偶联物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及治疗剂或细胞毒性剂与生物活性肽的偶联物及其应用。

背景技术

[0003] 氨基甲酸酯化合物作为前体药物 (prodrug) 为人所熟知。氨基甲酸酯化合物非常适合于前体药物的设计,因为它们可以用于母体药物的再生,而不管与载体分子之间的连接点是羟基基团还是胺基基团。基于分子内环化的氨基甲酸酯前体药物从 20 世纪 80 年代开始即有报道。例如,美国专利 4812590(相应于 EP0296811)披露了 4-羟基甲氧基苯氨基甲酸酯的衍生物作为前体药物以在黑素瘤中给予和浓缩 4-羟基甲氧基苯。Vigroux 等 (J. Med. Chem. 38, 3983-3994, 1995) 公开了对乙酰氨基酚整合 N-(取代 2-羟苯基) 和 N-(取代 2-羟丙基) 氨基甲酸酯作为前体药物。

[0004] 理想的前体药物设计是将药物与生物活性载体整合以使药物在血液循环中十分稳定,而在靶细胞中内化时释放出药剂。通过不同的化学方法,利用不同类型的接头技术企图达到该目的。特别考虑的是两种类型的生物降解现象,即被动水解和酶水解。被动水解发生在简单的化学分解导致的分子降解过程中;酯、碳酸酯、酰胺和氨基甲酸酯均对水解有不同程度的敏感性,在碱性 pH 条件下,稳定性顺序如下:氨基甲酸酯 > 酰胺 > 碳酸酯 > 酯。酶水解发生在血液循环和内化过程中。如果欲期目的是将偶联物传送到靶细胞中,则需要偶联物对血浆中的酶具有较高的抗性,因为这些酶在血液循环过程中能够降解复合物。通常利用的酯衍生物不是特别理想的选择,因为作为接头可被在血液中普遍存在的酯酶所降解。

[0005] 另外一种接头技术是利用在细胞内和细胞外之间存在的 pH 差别。溶酶体负责细胞内的分子降解,合适的 pH 值为 4-6,而血浆和细胞外液体的 pH 值为 7.4。可以设计一种在 pH 7 时稳定而在 pH 5 时被降解的接头,假设偶联物不为被动水解或血浆中的酶水解,那么这种接头可以用于将偶联物传递到靶细胞。然而,这种接头技术不适合于肽偶联物,这是因为合成肽的多数合成 (work-up) 和纯化是在酸性介质中进行的。

[0006] 另外的化学接头技术是利用溶酶体中的特定的酶。例如,许多肽序列在血浆中稳定,但可被特定的溶酶体酶所切割。

[0007] 许多这些治疗方法中,正如瘤形成疾病的标准治疗方法一样,均具有毒副作用,这就严重限制了对病人给予活性药剂的量。此外,许多活性药剂导致组织特异性毒性,进一步限制了传递给靶组织的剂量。例如,许多蒽环族 (anthracycline family) 成员对心脏具有毒性导致这类化学治疗剂的最大剂量的降低。

[0008] 促生长素抑制素、铃蟾肽和其它生物活性肽类似物已用于检测那些过量表达特异

于这些肽的受体的肿瘤细胞（如参见 Denzler and Reubi, *Cancer* 85(1) :188-198, 1999）。况且，促生长素抑制素、铃蟾肽和其它生物活性肽类似物在与其受体结合后很快被内化（如参见 Lukinius et al, *Acta Onc.* 38 :383-387, 1999）。这种肽类似物的内化可能导致转移到细胞核（Chen 等, *Am. J. Physiol. Renal Physio*, 279 :F440-F448, 2000）。

[0009] 促生长素抑制素类似物结合到促生长素抑制素受体亚型，后者存在于特定正常或发病组织的表面。促生长素抑制素受体在特异性发病组织中上调，包括炎性肠道疾病、类风湿性关节炎、各种肿瘤以及提供肿瘤的血管（Denzler and Reubi, *Cancer*, 85 :4188-198, 1999）。类似地，特异于其它生物活性肽的受体，P 物质（Substance P），在许多疾病中上调。

[0010] 至少有 5 个促生长素抑制素受体亚型被鉴定出，而肿瘤可以表达各种受体亚型（Shaer, et al., *Int. J. Cancer* 70 :530-537, 1997）。天然的促生长素抑制素和其类似物对这些受体亚型呈现出不同的结合特性，使肽类似物能够精确靶向特异的发病组织。

[0011] 许多细胞毒性剂的物理和化学特性使药物结合到活性肽上存在问题，如促生长素抑制素、铃蟾肽。例如，药物可以减少类似物的结合特异性或生物活性，限制了作为靶向剂的效力。此外，治疗剂和细胞毒性剂具备的化学性质可能促进在特定组织中药物-肽类似物的积累，增大毒性和降低效果。有效的方法是将细胞毒性剂与靶向分子如生物活性肽或抗体连接，但仍然保持每一种成分的活性以满足治疗效果最大化的需求，同时将毒性降至最低。

发明内容

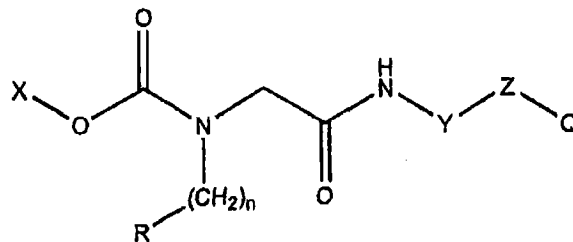
[0012] 本发明涉及治疗剂或细胞毒性剂与靶向部分的偶联物。具体的是，本发明涉及具有可切割的化学接头的偶联物，以降低治疗剂或细胞毒性剂在血液循环中的释放，因而使偶联物的活性成分能更容易被细胞内化，以及容易控制活性成分在细胞内的释放速率。

[0013] 相应地，一方面，本发明涉及通过氨基甲酸酯接头偶联到化学物质上的生物活性肽。本发明偶联物具有许多优点，如保持肽的生物活性、增强偶联物在血浆中的稳定性及其连接化合物在细胞内的释放。本发明偶联中使用的肽优选为促生长素抑制素、促生长素抑制素类似物、铃蟾肽、铃蟾肽类似物、KiSS 肽及其类似物、硬骨鱼紧张肽 II 肽及其类似物、GnRH I 和 II 肽及其类似物、奥曲肽、depreotide、vaptotide、血管活性肠肽（VIP）、缩胆囊素（CCK）、胰岛素样生长因子（IGF）、含 RGD 肽、黑素细胞刺激激素（MSH）肽、神经降压素、降钙素、含有抗肿瘤抗体的互补决定区的肽、谷胱甘肽、YIGSR（白细胞亲合（leukocyte-avid）肽，如 P483H，其包含血小板因子-4（PF-4）的肝素结合区和富含赖氨酸序列）、心房利钠肽（ANP）、 β -淀粉样肽、 δ -阿片拮抗剂（如 [125 I]ITIPP(psi) [H-Tyr(3'I)-Ticpsi[CH₂NH]Phe-Phe-OH] ;ITIPP(psi))、膜联蛋白-V、内皮素、白细胞介素（IL）-1、IL-1ra、IL-2 和 IL-8、白三烯 B4（LTB4）、趋化肽（如 N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯基丙氨酸-赖氨酸（fMLFK））、GP IIb/IIIa 受体拮抗肽（如 DMP444）、表皮生长因子、人嗜中性弹性蛋白酶抑制剂（如 EPI-HNE-2 和 EPI-HNE-4）、血浆酶抑制剂、抗菌肽、apticide（如 P280 和 P274）、血小板反应蛋白受体（包括其类似物如 TP-1300）、bitistatin、I 型垂体腺苷酰环化酶受体（PAC1）、纤维蛋白 α -链、以及它们的衍生物和类似物。也包括那些来自噬菌体展示文库的肽及其保守性取代获得的肽，其靶向哺乳动物体内的细胞或组织（如发病组织，如肿瘤或增殖性血管源性血管，如参见 Aina et al., *Biopolymers* 66 :184-199,

2002)。这些肽可用于将治疗剂和细胞毒性剂特异的靶向于哺乳动物体内的如癌症细胞或组织（例如将抗细胞程序性死亡药物给予到心脏或脑组织）、或者选择性靶向于白细胞或结核感染的结节。例如，当促生长素抑制素或铃蟾肽被用作本发明偶联物中的生物活性肽时，治疗剂或细胞毒性剂可以靶向于表达了促生长素抑制素受体或铃蟾肽受体的癌细胞。本发明也涉及相应的可以偶联到本发明偶联物上的抗体（如单克隆抗体）或其片段。如上关于肽的描述，当抗体整合到本发明的偶联物上，治疗剂或细胞毒性剂可靶向于特异的抗体结合位点。

[0014] 本发明第一方面的偶联物具有如下通式：

[0015]



[0016] 其中：X 是细胞毒性剂或治疗剂；

[0017] n 是 0-6 的整数，其中 $(\text{CH}_2)_n$ 是取代的或未取代的、直链或支链、或者是烷基、链烯基、炔基、环基、杂环基、芳基或杂芳基基团；

[0018] R 是 $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$ 、 OR_1 或 SR_1 ，其中 R_1 和 R_2 是独立的氢或低级烷基；

[0019] Y 是亲水性间隔序列或者缺失；

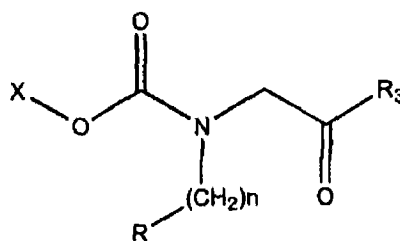
[0020] Z 是连接肽或者缺失；及

[0021] Q，若存在时为靶向部分。

[0022] 在本发明的这一方面以及其它方面，烷基基团优选包含 1-8 个碳原子；链烯基优选包含 1-X 个碳原子；炔基基团包含 1-X 个碳原子；环基基团包含…

[0023] 本发明第二方面的偶联物包含如下结构：

[0024]



[0025] 其中：X 是细胞毒性剂或治疗剂；

[0026] n 是 0-6 的整数，其中 $(\text{CH}_2)_n$ 是取代的或未取代的、直链或支链、或者是烷基、链烯基、炔基、环基、杂环基、芳基或杂芳基基团；

[0027] R 是 $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$ 、 OR_1 或 SR_1 ，其中 R_1 和 R_2 是独立的氢或低级烷基， R_3 是 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SH}$ 基团（其中 $m = 2-6$ ）、D 或 L 半胱氨酸、二苯甲酮（如对苯甲酰基-苯丙氨酸）或 OH 基团。具有这种通式的偶联化合物可以通过包含硫醇、羧酸根或光敏二苯甲酮的 R_3 基团而连接到肽、蛋白或抗体上。此外，可容易的通过直接在化合物上合成肽或蛋白来制备肽或蛋白质。例如，可以提供 R 基团是 tBoc 保护的初级或次级氨基基团的化合物，并且可添加到下面实施例描述的肽基树脂。当 R_3 基团包含硫醇基团，肽、蛋白或抗体也可通过利用已知的硫醇-化

学反应而连接到化合物上,或当 R_3 基团包含二苯甲酮时,通过光敏反应来进行连接(参见 Greg T. HERMANSON, "BIOCONJUGATE Techniques" p. 146-152, 1996)。

[0028] 在本发明的所有方面的优选实施例中, X 是细胞毒性剂,选自:喜树碱、同型喜树碱、秋水仙碱、combretastatin, dolistatin, 阿霉素、氨甲蝶呤、鬼臼毒素、华根毒素(rhizoxin)、华根毒素 D、紫杉醇(taxol)、紫杉醇(paclitaxol)、CC1065 或者美登木素生物碱、以及它们的衍生物和类似物。例如细胞毒性剂喜树碱通过它的单个游离羟基基团连接到氨基甲酸酯上。在这些实施方式中, n 优选为 2, R 优选为 NH_2 。

[0029] Y 是亲水性间隔序列,优选是一种能增加偶联物的生物分布的肽,或者是亲水性聚合物。例如, Y 可以是能增加生物活性肽偶联物的亲水性生物分布的多肽序列。在优选实施方式中, Y 具有 $U(V-V)_n$ 的结构,其中 U 是 D-Pro、L-Pro、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、肌氨酸、Lys、Orn、Dab、Dap、4- NH_2 -Phe 或者 $(NH_2-(CH_2)_m-COOH)$, 其中 $m = 2-10$, 包括两端值,或者缺失;每一个 V 独立地选自: D-Ser、L-Ser、D-Thr、L-Thr、D-Gln、L-Gln、D-Asn、L-Asn、D-4-OH-Pro 或者 L-4 羟基-Pro; 和 $n = 1-50$, 包括两端值。在其它实施方式中每一个 V 独立选自 D-Ser 或者 L-Ser。另外的实施方式中,至少一个 V 是 D-氨基酸。

[0030] Y 可以是亲水性聚合物。例如, Y 可以是聚乙二醇、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、HPMA(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)或 HPMA 共聚物、 α, β -聚(N-羟乙基)-DL-天冬酰胺(PHEA)或 α, β -聚(N-羟丙基)-DL-天冬酰胺。

[0031] Z 作为接头肽,当通过 Q 的末端或侧链氨基基团而结合到 Q 上时,能够保持 Q 的至少 50% 生物活性。通常, Z 可以是具有 2、3、4 或 5 个残基的肽。Z 具有如下结构: A-B-C-E-F, 其中 A 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser 或 L-Ser, 或者缺失; B 是 D-Lys 或 D-Tyr, 或者缺失; C 是 Lys、Ser、hSer、Thr、Nle、Abu、Nva、(2, 3 或 4)-吡啶-Ala(Pal)、Orn、Dab、Dap、4- NH_2 -Phe、D-4-OH-Pro 或 L-4-OH-Pro, 或者缺失; E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5-二碘(diido)-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5-碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln; F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5-二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5-碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln; 当 A、B、C 和 E 分别是 Tyr、Tyr、Lys 和 Tyr 时,则 F 不能是 Lys; 当 A、B、C 和 E 分别是 Lys、Tyr、Lys 和 Tyr 时,则 F 不能是 Tyr 或 Lys; 当 A 和 B 缺失时,且 C 和 E 分别是 Lys 和 Tyr 时,则 F 不能是 Tyr 或 Lys。在有的肽中, Z 优选为缺失。

[0032] 在其它实施方式中, Z 具如下结构(当 A、B 和 C 缺失时):

[0033] E-F

[0034] 其中 E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5-二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5-碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln; F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5-二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5-碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln。

[0035] 在优选实施方式中, Z 是 D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser(SEQ ID NO:1)、D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser(SEQ ID NO:2)、D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr(SEQ ID NO:3)、D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser(SEQ ID NO:4)、D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser(SEQ ID NO:5)、

D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO :5)、D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :6)、D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :7)、D-SER-THR-D-TYR-D-SER (SEQ ID NO :8)、Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO :9)、Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO :10)、Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO :10)、Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :11)、Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :12)、Pal-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO :13)、Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :14)、D-Ser-D-Lys、D-Ser-D-Tyr、D-Lys-D-Lys、D-Lys-D-Tyr 或 D-Tyr-D-Lys。

[0036] Q 是靶向部分,如是生物活性肽或来自噬菌体的肽。在优选实施方式中, Q 是肽,如促生长素抑制素、促生长素抑制素类似物、铃蟾肽、铃蟾肽类似物或是抗体,如单克隆抗体。优选地,生物活性肽或靶向部分被特定的细胞通过活性内化方法而内化,例如当结合到 G- 蛋白偶联的受体或促生长素抑制素 2 型受体 (SSTR2) 上时。

[0037] 本发明另一方面是一种处理疾病或修饰生物功能的方法。该方法包括将有效治疗或生物功能修饰所需量的本发明偶联物给予温血动物,如人。本领域技术人员可以意识到根据将要治疗的疾病的病情或将要修饰的生物体系而选择特定的偶联物。具体的说,本领域技术人员能够选择特定的靶向部分和细胞毒性剂或治疗剂来制备成本发明的偶联物,而可以特异性的治疗疾病或修饰欲期的生物功能。在优选实施方式中,所述疾病是肺肿瘤、乳肿瘤、脑肿瘤、眼肿瘤、前列腺肿瘤或结肠肿瘤或神经内分泌起源的肿瘤(如类癌综合症)。所述疾病也可能是由于血管增殖引起的病症或导致血管增殖的病症。

[0038] “给药”或“给予”意指对哺乳动物给予给定剂量的药物组合物,其中所述方法如经皮、口、静脉、腹膜或肌肉途径进行给药。优选的给药方式可根据不同的因素,如组合物的成分、潜在或实际发病的位点或病情的严重程度。

[0039] 在本发明中对化合物的一般性描述中,取代基的特定类型中的原子个数通常是一个范围。如烷基基团包含 1 至 8 个碳原子或 C_{1-8} 烷基。对于这种范围包括了原子数为这一特定范围内的每一个整数。例如,含 1 至 8 个碳原子的烷基基团包括了 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 和 C_8 。杂烷基 C_{1-8} 包括 1 至 8 个碳原子以及 1 个或多个杂原子。原子的其它数目和其它原子类型可通过类似的方式来表示。

[0040] 在此处,“烷基”意包括脂肪族支链或直链烃基及其组合。烷基可选地被一个或多个相同或不同的取代基所取代。烷基基团包括 1 至 20 个碳原子,优选为 1 至 8 个碳原子。实例包括甲基、乙基、n-丙基、n-丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基、辛基等。“低级烷基”是指支链或直链基团含有少于 11 个碳原子,优选为 C_1 - C_8 烷基。“低级烷基酰胺”是指如上所述的低级烃基基团被一个或多个含酰胺的基团所取代。在此处,“烷基”和前缀“烷-”也可指环状基团,即环烷基和环链烯基团。环状基团可以是单环或者多环的,优选为包括 3-8 个碳原子组成的环,含端值。

[0041] 术语“链烯基”,单独或组合,意指具有一个或多个双键的直链或支链烃链,其包括 2 至 20 个碳原子,优选为 2 至约 8 个碳原子。术语“炔基”,单独或组合,意指具有一个或多个三键的直链或支链烃链,其包括 2 至 20 个碳原子,优选为 2 至约 8 个碳原子。

[0042] “杂烷基”指支链或非支链中有一个或多个亚甲基 ($-CH_2$) 被氮、氧、硫、羰基、硫代羰基、磷酰基、磺酰基或 NR(其中 R 为烷基)所取代。其中的一些例子包括叔胺、醚、硫醚、酰胺、硫代酰胺、氨基甲酸酯、硫代氨基甲酸酯、氨基磷酸酯、氨磺酰、二硫化物。杂烷基可选包括单环、双环或三环,其中每一个环具有 3 至 6 个原子组成。杂烷基可以是被取代或未取

代的。

[0043] “类似物”指不同于相应原始分子,但在结构、功能和 / 或化学性质方面与之相关的分子。类似物可保持相应原始分子的本质特性、功能或结构。最优选地,类似物保持相应分子的至少一种生物活性。通常,其差别是有限的以至于相应原始分子与其类似物在结构或序列在整体上是相似的。肽类似物与相应原始分子可能在氨基酸序列存在由于一个或多个取代、增加和 / 或缺失或其结合所导致的序列差别。取代或插入氨基酸残基可以是也可以不是肽类似的遗传密码所编码。肽或多肽的类似物可以自然发生的,如等位基因变体,或者不是自然发生的变体。非自然发生的肽类似物可通过直接合成、修饰或突变技术来获得。

[0044] “生物活性肽”指任何自然发生、经修饰或合成的肽,参与了生物程序或功能。生物活性肽的实例包括,但不局限于:激素、生长因子、神经递质、抗原、抗体或其片段。

[0045] 术语“铃蟾肽”指铃蟾肽或具有天然铃蟾肽的至少一种生物活性的类似物;优选地,所述活性是在携带铃蟾肽受体的细胞上能够特异性结合到 1 种或所有 3 种铃蟾肽受体亚型上。铃蟾肽类似物包括但不局限于选自含有具有 G-Trp-H-I-His-J-K-NHV (SEQ ID NO: 15) 结构的八肽的组,其中 G 是 Gln、Asn、Nle 或 Nva;H 是 Ava、Gly、Leu、Val、Ile、Nle 或 Nva;I 是 β -Ala、4-氨基丁酸、Gly、Ala、D-Ala、N-Me-Ala 或 N-Me-D-Ala;J 是 Phe、Tyr、4-氯-Phe、4-氟-Phe、4-溴-Phe、4-NO₂-Phe、Ala、Gly、Leu、Val、Ile、Nle 或 Nva;K 是 Met、Phe、Tyr、4-氯-Phe、4-氟-Phe、4-溴-Phe、4-NO₂-Phe、Ala、Gly、Leu、Val、Ile、Nle 或 Nva;N 代表酰胺基或 N-烷基酰胺,及 V 是 H 或低级烷基酰胺。

[0046] “环”指具有 3 至 10 个碳原子,更优选为 3 至 6 个碳原子的烃基基团。

[0047] “细胞毒性剂”指天然的、经修饰的或合成的对肿瘤细胞有毒性的化合物。这些药剂在处理肿瘤,以及炎症性疾病、自体免疫紊乱及其它由细胞增殖或细胞群活动亢进导致的疾病或症状中有益。细胞毒性剂包括,但不局限于:烷基化物、抗生素、抗代谢物、微管蛋白抑制剂、拓扑异构酶 I 和 II 抑制剂、激素激动剂或拮抗剂、免疫调制剂。细胞毒性剂可以是能被光或红外线激活而具有细胞毒性的物质 (PHOTOFRIN, IR dyes; Nat. Biotechnol. 19(4):327-331, 2001), 也可能通过其它途径来发挥毒性作用或者是辅助增强剂。

[0048] “亲水性生物分布”指本发明肽剂对用药受体的体液(如血液、脑脊髓液、尿液或其它体液)的亲水性,这样肽剂分布到受体的整个身体,但通过肾脏以尿的形式被分泌出去而避免被外围组织如肝脏、胆囊和接近肾的细管所吸收。

[0049] “亲水性聚合物”指天然地或合成的水溶性聚合物,可选地修饰以改变本发明肽剂的生物分布性。这种聚合物的例子包括,但不局限于聚(乙二醇)(PEG)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚乙酸乙烯酯、葡聚糖、羟乙基淀粉、白明胶、PVP、PHPMA、 α , β -聚[N(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺(PHEA)、聚琥珀酰胺(PSI)、 α , β -聚(N-羟丙基)-DL-天冬酰胺等。可以对这些聚合物进行修饰,如琥珀酰化(负电荷)、部分水解 PSI(羧基基团)或与化合物反应以增加含氨基或羧基基团等。这种可选的修饰可以增加或改变聚合物的亲水性,或使之能够与本发明的肽或细胞毒性剂或治疗剂偶联。这种聚体和修饰方法在本领域中已知,也可参见如 Yamoaka et al., J. Pharmacol. Sci. 83:601-606, 1994; Rypacek et al., Pfluges Arch. 392:211-217, 1982; Yamoaka et al., J. Pharm. Pharmacol. 47:479-486, 1995; Francesco, Bioconjugate Chemistry 9(4):418-450, 1998; Duncan and Spreafico,

Clin. Pharmacokinet. 27(4):290-306, 1994 中的描述, 在此将上述每一篇文献的全部内容引入本发明作为参考。

[0050] “亲水性间隔序列”指亲水性肽或亲水性聚合物以增加本发明化合物的生物分布, 如通过抑制外周积累和 / 或促进肾的清除。在本发明中使用的亲水性间隔序列的实例如此处所提及的。

[0051] “肽”指含两个或多个氨基酸通过肽键或修饰肽键相互连接的任何多肽、肽 (包括环状或支链肽) 或者蛋白质。在此处, 肽指称为肽、寡肽或寡聚体的短链, 也可指长链, 长度可达约 100 个残基。肽可包含除基因编码的 20 个氨基酸之外的氨基酸, 且可通过非肽键连接。肽可包括由生物程序或已知的化学修饰技术而修饰的氨基酸序列。修饰可发生在多肽的任何位置, 包括肽的主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。

[0052] 此处使用的肽氨基酸残基的符号是本领域常规的缩写。不常见的缩写 Abu、Ava、 β -Ala、hSER、Nle、Nva、Pal、Dab 和 Dap 分别代表 2-氨基丁酸、氨基戊酸、 β -丙氨酸、高丝氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、(2,3 或 4)-吡啶-Ala、1,4-二氨基丁酸和 1,3-二氨基丙酸。在本发明的所有方面, 当氨基酸符号之前没有 D 和 L 时, 则该氨基酸可以是 L 氨基酸, 也可以是 D 或 L 氨基酸, 除非上下文中指明是特定的异构体。

[0053] “促生长素抑制素肽”指促生长素抑制素, 或具有天然促生长素抑制素的至少一种生物活性的类似物。优选地, 该活性指能够在携带促生长素抑制素受体的细胞上与促生长素抑制素受体结合。许多具有生物活性的类似物是已知的, 如描述于 Hornik et al. U. S. P. N. 5, 770, 687; Coy et al. U. S. P. N. 5, 708, 135; Hoeger et al. U. S. P. N. 5, 750, 499; McBride et al. U. S. P. N. 5, 620, 675; Coy et al., U. S. P. N. 5, 633, 263; Coy et al. U. S. P. N. 5, 597, 894; Taylor et al. U. S. P. N. 5, 073, 541; Coy et al. U. S. P. N. 4, 904, 642; Dean, U. S. P. N. 6, 017, 509; Hoffman et al. WO 98/47524 和 A. E. Bogden, U. S. P. N. 5, 411, 943, 上述每一篇文献的全部内容在此引入本发明中作为参考。

[0054] “靶向部分”指能与给定靶细胞群相关的受体或其它接受部分特异结合或反应性结合或复合的分子。该细胞反应性分子, 在偶联物中通过接头与药物制剂连接, 可以是与将要对其治疗或进行生物修饰的细胞群进行复合或反应的任何分子, 其拥有自由反应的氨基基团或可被修饰成含有这样的氨基基团。细胞反应性分子的作用是传递偶联物, 因而细胞毒性剂或治疗剂能够与特定的靶细胞群发生配体反应。这种分子包括, 但不局限于大分子量的蛋白 (通常高于 10000 道尔顿), 例如抗体、或小分子量的蛋白质 (通常低于 10000 道尔顿)、多肽或肽配体和非肽配体。

[0055] “治疗剂”指用于检测、诊断或治疗人类疾病的任何化合物。这样的化合物可是天然的、经修饰的或合成的化合物。治疗剂可以促进或抑制人疾病过程中的生物程序。优选的靶疾病包括但不限于: 炎性肠道疾病、类风湿性关节炎、瘤性细胞程序性死亡、心脏组织、畸形增殖性细胞、类癌综合征、肢端肥大症、结核、导致血管非正常增殖的血管生成 (眼球中过度增殖导致的黄斑病变)。治疗剂可以是, 例如抗肿瘤剂, 包括细胞毒性剂。抗肿瘤剂可以是烷基化物、抗生素、抗代谢物、激素激动剂或拮抗剂、微管蛋白抑制剂、I 和 II 型拓扑异构酶抑制剂、抗-或促程序性死亡剂或免疫调制剂。抗肿瘤剂可以通过其它机制发挥作用或者抗肿瘤剂是一种辅助增强剂。

[0056] “治疗”指以预防和 / 或治疗疾病为目的的给予药物组合物。“预防疾病”指对还未发病但对特定疾病敏感或处于发病的危险之中的患者进行预防处理。“治疗疾病”或“治疗处理”指对已经患病的患者给予药物以减轻发病或改善患者的病情。因此,在权利要求和实施方式中,治疗一词指治疗或预防为目的对哺乳动物给药。

附图说明

[0057] 图 1 表示在树脂上合成包含 BINAR 基团的促生长素抑制素类似物和经氨基甲酸酯连接基团而连接喜树碱,继而从树脂上去除而获得化合物 2。碱或酶处理导致游离喜树碱的亲核体辅助释放。

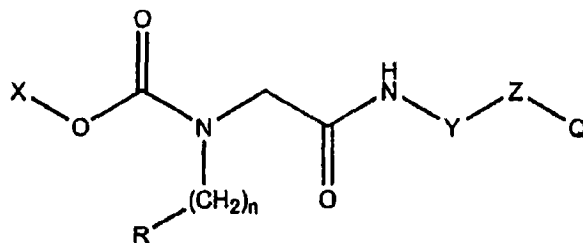
[0058] 图 2 表示偶联物 1-6 的剂量反应曲线,以及通过细胞活性 MTT 分析得出的偶联物 1-6 杀死促生长素抑制素受体亚型 2 (SSTR2) 阳性 IMR-32 细胞的能力。

具体实施方式

[0059] 本发明涉及细胞毒性剂或治疗剂与生物肽的偶联物。这些偶联物对于其中的细胞毒性剂或治疗剂的给药提供许多优点。本发明的偶联物可直接针对靶位点和特异性细胞,使细胞毒性剂或治疗剂能够有效的内化。此外,本发明偶联物降低了细胞毒性剂或治疗剂在血液循环中的释放。本发明偶联物可以按需要进行改进以调整细胞毒性剂或治疗剂的释放。

[0060] 本发明偶联物具有如下通式:

[0061]



[0062] 其中 :X 是细胞毒性剂或治疗剂 ;

[0063] n 是 0-6 的整数,其中 $(CH_2)_n$ 是取代的或未取代的、直链或支链、或者是烷基、链烯基、炔基、环基、杂环基、芳基或杂芳基基团 ;

[0064] R 是 $N(R_1R_2)$ 、 OR_1 或 SR_1 , 其中 R_1 和 R_2 是独立的氢或低级烷基 ;

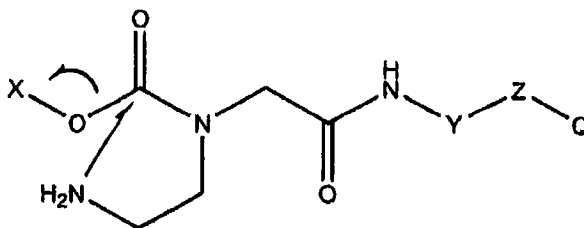
[0065] Y 是亲水性间隔序列或者缺失 ;

[0066] Z 是连接肽或者缺失 ;及

[0067] Q 为靶向部分。

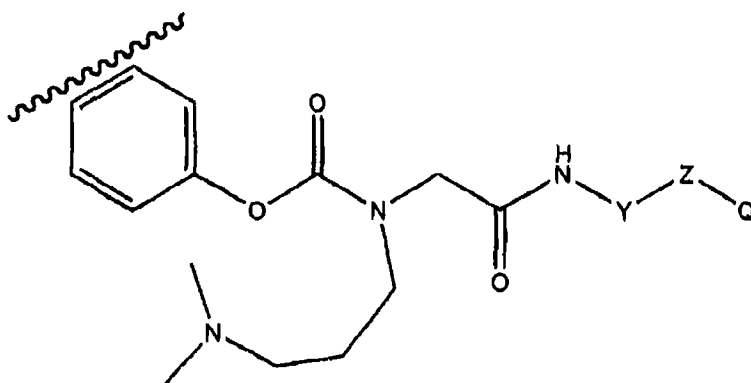
[0068] 根据本发明,细胞毒性剂的释放可以通过改变偶联物的化学结构来控制。例如,当 R 是 NH_2 和 $n = 2$ 时,发生下述置换反应 :

[0069]



[0070] 在上述反应机理中,不受理论限制,亲核基团依 n 而可以调节的协助细胞毒性剂或治疗剂(标为“X-OH”)在胞内释放。根据碳氢侧链的长度而使亲核反应增强或变弱,即根据 n 值,或通过将 R 改变为 NCH_3 、OH 或 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 。例如,即当细胞毒性剂通过羟基 -OH 基因而结合到氨基甲酸上时,如喜树碱、同型喜树碱、秋水仙碱、combretastatin、dolistatin、阿霉素、氨甲蝶呤、鬼臼毒素、华根毒素(rhizoxin)、华根毒素 D、rocag1 酰胺、蛇形菌素、紫杉醇(taxol)、紫杉醇(paclitoxol)、CC1065 或者美登木素生物碱,此时优选 $n = 2$ 。然而,当细胞毒性剂基团(如 combretastatin 或 rocag1 酰胺)是通过芳基 -OH 基团偶联时,优选 R 为 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 和 $n = 3$ 。

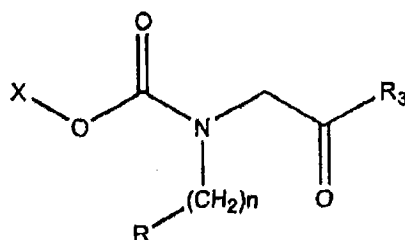
[0071]



[0072] 因此,根据此处的教导明显可知,本发明偶联物可按需要来进行设计,以控制细胞毒性剂或治疗剂的释放。

[0073] 本发明也涉及具有下述通式的化合物

[0074]



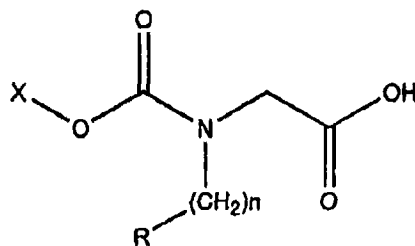
[0075] 其中:

[0076] X 是细胞毒性剂或治疗剂;

[0077] n 是 0-6 的整数,其中 $(\text{CH}_2)_n$ 是取代的或未取代的、直链或支链、或者是烷基、链烯基、炔基、环基、杂环基、芳基或杂芳基基团;

[0078] R 是 $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$ 、 OR_1 或 SR_1 , 其中 R_1 和 R_2 是独立的氢或低级烷基, R_3 是 $(\text{CH}_2)\text{SH}$ 基团或 OH 基团。如具有下式的化合物:

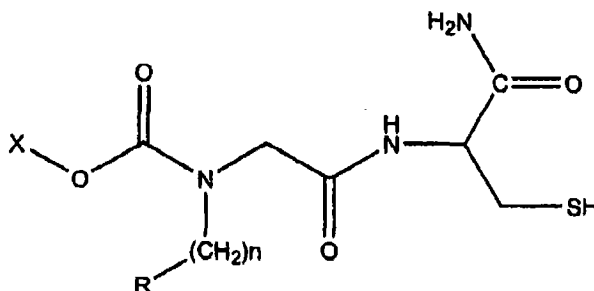
[0079]



[0080] 可以用于将化合物连接到肽、蛋白或抗体上。此外，肽或蛋白可直接在该偶联物上进行合成，因而提供了一种简单的制备包含肽或蛋白的偶联化合物的方法。可以提供 R 基团是 tBoc 保护的初级或次级氨基基团的化合物，且可按下面实施例中描述的方法将肽或蛋白附加到化合物上。

[0081] 肽、蛋白和抗体可以连接于具有下式的化合物上：

[0082]



[0083] 其中未被保护的 R 衍生物可以用于连接肽、蛋白和抗体，这通过已知的硫醇反应性的化学反应而连接到在 R₃ 位置的硫醇部分上（如参见 Greg T. Hermanson, “Bioconjugate Techniques” p. 146-152, 1996 和下面的实施例 21）。

[0084] 本发明的所有偶联物中，X 优选地选自包含初级、次级、三级、苄型或酚式羟基基团的细胞毒性剂和治疗剂。对于缺乏羟基基团的细胞毒性剂或治疗剂，本领域技术人员可以想到通过已知的方法制备成含有羟基基团的衍生物。

[0085] 那些治疗癌症的细胞毒性剂优选的，例如，烷基化物、抗增殖剂、微管蛋白结合剂等。优选的细胞毒性剂类型包括，如蒽环族 (anthracycline family) 的药物、长春碱药物、丝裂霉素、博来霉素、细胞毒性核苷、喋啶族药物、diynenes、鬼臼毒素。这些类型中尤其有用的成员包括，如阿霉素、洋红霉素、正定霉素、氨喋呤、氨甲喋呤、甲喋呤、二氯氨甲喋呤、丝裂霉素 C、甲基丝裂霉素、5- 氟尿嘧啶、6- 巯基嘌呤、阿糖胞苷、鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物如足叶乙甙或足叶乙甙磷酸、左旋溶内瘤素、长春碱、长春新碱、异长春碱、长春地辛、长春素等。如前面所提到的，本领域技术人员可通过化学修饰获得欲期的化合物以使化合物能够更方便用于制备本发明偶联物。在优选实施方式中，X 是选自下述的细胞毒性剂：喜树碱、同型喜树碱、秋水仙碱、combretastatin、dolistatin、阿霉素、氨甲喋呤、鬼臼毒素、华根毒素、华根毒素 D、紫杉醇 (taxol)、紫杉醇 (paclitaxol)、CC1065 或者美登木素生物碱、以及它们的衍生物和类似物。例如，细胞毒性剂喜树碱通过唯一游离羟基基团连接到氨基甲酸酯接头上，衍生得到硫醇化的秋水仙碱，以便其含有羟基基团，因而适合所述连接基团技术。在此实施方式中，n 优选为 2 和 R 优选为 NH₂。

[0086] 本发明的偶联物，X 可以是细胞毒性剂或治疗剂，例如抗肿瘤药，如阿西维辛、阿克位霉素、盐酸安喹咪唑、阿克罗宁、阿多来新、盐酸阿霉素、阿地流律、六甲密啶、偶氮霉素 C、醋酸阿美蒽醌、氨格鲁酮、安 Y 啶、阿那曲唑、安曲霉素、天冬酰胺酶、曲林菌素、阿扎胞苷、

阿扎替派、含氮霉素、巴马司他、苯佐替派、比卡鲁胺、比生群、双奈法德 (Dimesylate)、比折来新、硫酸博来霉素、布喹那钠、澳匹立明、甲磺酸丁二醇二酯、放线菌素 C、卡鲁唑酮、喜树碱、卡醋胺、卡贝替姆、卡铂、卡氯芥、卡柔比星、卡折来新、西地芬戈、苯丁酸氮芥、西罗霉素、顺铂、克拉曲滨、秋水仙碱、Combretastatin A-4、甲磺酸屈那托、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、DACA(N-[2-(二甲基-氨基)乙基]吡啶-4-酰胺)、放线菌素 D、正定霉素阿霉素、正定霉素、地西他滨、右奥马铂、地扎哌宁、甲磺酸地扎哌宁、地 Y 醌、多西他塞、哌替啶、阿霉素、阿霉素氢氯化物、曲洛昔芬、曲洛昔芬柠檬酸、屈他雄丙酸酯、偶氮霉素、依达曲沙、依氟鸟氨酸、艾力替新、依沙芦星、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啶、表柔比星、厄布洛唑、依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀磷酸钠、依他硝唑、乙碘油 I 131、足叶乙甙、足叶乙甙磷酸、埃托啡、法倔唑、法扎拉滨、芬维 a 胺、氟尿苷、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、5-FdUMP、氟西他滨、磷喹酮、福司典星钠、吉西他滨、盐酸吉西他滨、金 Au 198、高喜树碱、羟基脲、依达比星、异环磷酰胺、依洛马司他、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n1、干扰素 α -n3、干扰素 β -1a、干扰素 γ -1b、异丙铂、伊立替康、兰瑞肽醋酸、来曲唑、亮丙瑞林醋酸、利阿唑、洛美曲索钠、洛莫司汀、洛索葱醌、马索罗酚、美登素、盐酸二氯甲基二乙胺、甲地孕酮醋酸、醋酸美仑孕酮、左旋溶肉瘤素、美诺立尔、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、氨甲蝶呤钠、氯苯氨啶、美妥替哌、米丁度胺、米托凯星、米托罗明、米托洁林、丝裂马菌素、丝裂霉素、米托司培、米托坦、盐酸米托葱醌、麦考酚酸、诺考达唑、诺加霉素、奥马铂、奥昔舒仑、紫杉醇、培门冬酶、佩里霉素、奈莫司汀、硫酸培来霉素、培磷酰胺、哌泊溴烷、哌泊舒凡、吡罗葱醌、普卡霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、紫菜霉素、泼尼莫司汀、盐酸甲苄肼、嘌呤霉素、盐酸嘌呤霉素、吡唑呋喃菌素、华根霉素、华根霉素 D、利波腺苷、罗谷亚胺、沙芬戈、盐酸沙芬戈、司莫司汀、辛曲秦、司帕磷酸钠、稀疏霉素、盐酸锗螺胺、螺莫司汀、螺铂、链黑菌素、链佐星、氯化锶 Sr 89、碘氯苯脲、他利霉素、紫杉碱 (Taxane)、Taxoid、Tecogalan Sodium、替加氟、盐酸替洛葱醌、替莫泊芬、替莫泊苷、替罗昔隆、睾内酯、硫秋水仙碱、硫米嘌呤、硫鸟嘌呤、三胺硫磷、Thymitaq、噻唑呋啉、替拉扎明、雷替曲塞、TOP53、盐酸拓扑替康、柠檬酸托瑞米芬、醋酸曲托龙、磷酸曲西立滨、三甲曲沙、葡糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林、盐酸妥布氯唑、芥氮、乌瑞替派、伐普肽、维替泊芬、长春碱、硫酸长春碱、长春新碱、硫酸长春新碱、长春地辛、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸长春西醇、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春罗定、硫酸长春利定、伏氯唑、折尼铂、净司他丁、盐酸佐柔比星、2-氯脱氧腺苷、2'-脱氧间型霉素、9-氨基喜树碱、雷替曲塞、N-炔丙基-5,8-dideaza 叶酸、2-氯-2'-阿拉伯糖-氟-2'-脱氧腺苷、2-氯-2'-脱氧腺苷、茴香霉素、曲克抑菌素 A、hPRL-G129R、CEP-751、罗喹美克、硫芥子气、氮芥、环磷酰胺、左旋溶肉瘤素、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、甲磺酸丁二醇二酯、N-甲基-N-亚硝基脲 (MNU)、N, N'-双(2-氯乙基)-N-亚硝基脲 (BCNU)、N-(2-氯乙基)-N'-环己基-N-亚硝基脲 (CCNU)、N-(2-氯乙基)-N'-(反式-4-甲基环己基)-N-亚硝基脲 (MeCCNU)、N-(2-氯乙基)-N'-(二乙基)乙烷基磷酸-N-亚硝基脲、链脲霉素、乙酰唑胺碱 (DTIC)、米托唑胺、泰莫佐罗、噻替派、丝裂霉素 C、AZQ、阿多来新、顺铂、卡铂、奥马铂、奥沙利铂、C1-973、DWA 2114R、JM216、JM335、Bis(铂)、tomudex、阿扎胞苷、阿糖胞苷、吉西他滨、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、次黄嘌呤、替力泊苷、9-氨基喜树碱、拓扑替康、CPT-11、阿霉素、正定霉素、表柔比星、darubicin、米托葱醌、洛索葱醌、放线菌素 D、安 Y 啶、吡唑吡啶、全-反-aphthal-14-羟-逆-维生素 A、全反-视黄酸、N-(4-羟基苯基)维安酯、13-顺视黄酸、3-甲基

TTNEB、9- 顺视黄酸、氟达拉滨 (2-F-ara-AMP) 或 2- 氯代脱氧腺苷 (2-Cda)。

[0087] 其它适合的抗肿瘤药包括,但不局限于:20- π -1,25 二羟基维生素 D3、5- 乙炔尿嘧啶、阿比特龙、阿柔比星、acylfulvene、adecyphenol、阿多来新、阿地白介素、全酪蛋白激酶拮抗剂、六甲密胺、氨莫司汀、磺胺异恶唑、氨磷汀、氨基乙酰丙酸、氨柔比星、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、穿心莲内酯、血管发生抑制剂、拮抗剂 D、拮抗剂 G、安雷利克斯、抗- β 气管形态发生蛋白-1、抗雄性激素、前列腺癌、抗雌激素、抗恶性肿瘤物质、反义寡核苷酸、艾菲地可宁 (aphidicolin) 甘氨酸盐、细胞程序性死亡基因调制剂、细胞程序性死亡调制剂、无嘌呤核酸、ara-CDP-DL-PTBA、精氨酸脱氨酶、asulacrine、阿他美坦、阿莫司汀、axinastatin 1、axinastatin 2、axinastatin 3、阿扎司琼、azatoxin、azatyrosine、浆果赤霉素 III 衍生物、balanol、巴马司他、BCR/ABL 拮抗剂、benzochlorins、benzoylstauosporine、 β 内酰胺衍生物、 β -alethine、betaclamycin B、桦木酸、基本纤维原生长因子 (BFGF) 抑制剂、比卡鲁胺、比生群、bisaziridinylspermine、双奈法德、bistratene A、比折来新、breflate、博来霉素 A2、博来霉素 B2、溴匹立明、布度钛、buthionine sulfoximine、卡铂三醇、calphostin C、喜树碱衍生物 (如,10- 羟基-喜树碱)、canarypox IL-2、卡培他滨、carbox 酰胺-氨基-三唑、羟氨基三唑、CaRest M3、CARN 700、软骨源抑制剂、卡折来新、酪蛋白酶抑制 (ICOS)、澳粟精胺、杀菌肽 B、西曲瑞克、绿素、磺胺氯唑 oxaline、西卡前列素、cis- 卟啉、克拉曲滨、氯米芬类似物、克霉唑、collismycin A、collismycin B、combretastatin A4、combretastatin 类似物、conagenin、crambescidin 816、克雷斯托、cryptophycin 8、cryptophycin A 衍生物、curacin A、cyclopentantraquinones、cycloplatan、cypemycin、阿糖胞苷 ocfosphate、细胞溶解因子、磷酸己烷雌酚、达昔单抗、地西他滨、dehydrodidemnin B、2'- 脱氧助间型霉素 (DCF)、地洛瑞林、芬氟拉明、右雷佐生、右维拉帕米、地吡酮、didemnin B、didox、diethylnorspermine、二羟-5- 氮胞苷、二羟紫杉醇、9-dioxamycin、联苯螺旋氮芥、discodermolide、二十二烷醇、多拉司琼、去氧氟尿苷、屈洛昔芬、屈大麻酚、duocarmycin SA、依布硒、依考莫司汀、依地福新、依决洛单抗、依氟鸟氨酸、榄烯、乙嘧替氟、表柔比星、epothilones (A, R = H, B, R = Me)、epithilones、依立雄胺、雌莫司汀类似物、雌激素亲和剂、雌激素拮抗剂、依他硝唑、足叶乙甙、足叶乙甙 4'- 磷酸 (etopofos)、依西美坦、法倔唑、法扎拉滨、芬维 a 胺、非那雄胺、flavopiridol、氟噻司汀、fluasterone、氟达拉滨、盐酸 fluorodaunorubicin、伏芬尼美司、福美坦、福司曲星、fotemustine、gadolinium texaphyrin、硝酸镓、galocitabine、加尼瑞克、白明胶酶抑制剂、吉西他滨、谷胱甘肽抑制剂、hepsulfam、heregulin、六甲撑、高三尖杉酯碱 (HHT)、hypericin、ibandronic acid、idarubicin、艾多昔芬、idramantone、ilmofosine、ilomastat、咪唑吡啶酮、咪喹莫特、免疫激刺肽、胰岛素生长因子-1 受体抑制、干扰素亲和剂、干扰素、白细胞介素、碘苄胍、碘阿霉素、呋喃戊酮醇、4- 伊立替康、iroplact、伊索格拉定、isobengazole、isohomohalicondrin B、itasetron、jasplakinolide、kahalalide F、lamellarin-N triacetate、缓释兰肽、leinamycin、重组人粒细胞集落刺激因子、硫酸香菇多糖、leptolstatin、来曲唑、白血病抑制因子、白细胞 α 干扰素、醋酸亮丙瑞林 + 雌激素 + 孕酮、亮丙瑞林、左咪唑、利阿唑、线性多胺类似物、亲脂二糖肽、亲脂铂化合物、澳棕三甲胺 7、洛巴铂、蚯蚓磷脂、洛美曲索、氯尼达明、losoxantrone、洛伐他汀、罗唑利宾、勒托替康、lutetium texaphyrin、溶血茶胺呋色酮、细

胞溶解酶、美登素、制甘糖酶素 A、马马司他、马丙考、脉丝平、matrilysin 抑制剂、matrix metalloproteinase 抑制剂、美洛格瑞、rnerbarone、meterelin、蛋氨酸酶、胃复安、mif 抑制剂、ifepristone、米替福星、米莫司定、错配双链 RNA、光辉霉素、丙米胺、二溴乳糖、丝裂霉素类似物、胺硝基酰胺、mitotoxin 纤维原细胞生长因子 - 皂草、米托蒽醌、mofarotene、莫拉司丁、单克隆抗体、人绒毛促性腺激素、一磷酸脂 A+ 丝杆菌细胞壁 sk、蒙匹胺醇、多药物抗性基因抑制剂、基于多肿瘤抑制剂 1 的治疗、芥菜抗癌因子、mycaperoxide B、丝杆菌细胞壁抽提物、myriaporone、N- 乙酰地那林、N- 取代苯甲酰胺、奈法瑞林、nagrestip、纳洛酮 + 戊唑辛、napavin、naphterpin、纳妥格拉斯、奈达铂、nemorubicin、奈立酸、中性肽链内切酶、里奴内酰胺、nisamycin、氧化一氮调制剂、硝基氧抗氧化剂、nitruillyn、6- 苄基鸟嘌呤、奥曲肽、okicenone、寡核苷酸、奥那斯酮、奥丹斯隆、二甲炔睾酮 - 二炔雌醇、口服细胞因子诱导剂、ormaplatin、osaterone、奥沙利铂、oxaunomycin、紫杉醇类似物、紫杉醇衍生物、palauamine、棕榈酰华根霉素、帕米膦酸、panaxytriol、巴洛米芬、三羟水杨酸、泊泽尼普定、天门冬酰胺酶、peldesine、聚硫酸钠戊聚糖、脱氧助间型霉素、pentrozole、perflubron、派磷酰胺、perillyl alcohol、吩嗪 phenazinomycin、乙酸苯酯、磷酸酶抑制剂、沙培林、毛果靶香碱氢氯化物、吡柔比星、比曲克辛、placetin a、placetin b、血浆酶原激活抑制剂、铂复合物、铂化合物、铂 - 三胺复合物、鬼臼霉素、叶吩姆纳、紫菜霉素、丙基双吡啶酮、前列腺素 J2、蛋白体抑制剂、蛋白 A- 免疫调制剂、蛋白激酶 C 抑制、蛋白激酶 C 抑制剂、microalgal、酪蛋白磷酸酶抑制剂、嘌呤核苷酸磷酸酯酶、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、红紫素、苯丁唑林吡啶、吡多酯血红素聚氧乙烯共聚物、raf 拮抗剂、雷替曲塞、拉莫西隆、ras farnesyl 蛋白转移酶 E 抑制剂、ras 抑制、ras-GAP 抑制剂、脱甲基化雷替尼卜定、铼 Re 186 依替磷酸钠、华根霉素、核酶、RII 维安酯、罗谷亚胺、rohitukine、胞壁酰基二肽、罗喹美克、rubiginone B1、ruboxyl、沙芬戈、saintopin、SarCNU、sarcophytol A、沙格司亭、Sdi 1 mimetics、司莫司汀、衰老抑制剂 1、有义寡核苷酸、信号传导抑制剂、信号传导调制剂、单链抗原结合蛋白、西索菲兰、索布佐山、sodium borocaptate、苯乙酸钠、solverol、生长调节激素结合蛋白、sonermin、sparfosic acid、spicamycin d、螺旋氮芥、斯耐潘定、海绵斯特汀 1、squalamine、干细胞抑制剂、干细胞分裂抑制剂、stipi 酰胺、stromelysin 抑制剂、sulfinosine、肠血管超活性肽抑制、suradista、苏拉灭、swainsonine、合成粘多糖、他利氮芥、三本氧胺甲碘化物、塔罗氮芥、他佐罗、tecogalan 钠、替加氟、碲化 tellurapyrylium、端粒酶抑制剂、替莫泊芬、泰莫佐罗、替尼泊昔、四氯 tetrachlorodecaoxide、四唑碱、thaliblastine、沙立度胺、硫 thiocoraline、thrombopoietin、thrombopoietin mimetic、胸腺法新、促胸腺生成素受体激动剂、thymotriganin、甲状腺刺激激素、tin ethyl etiopurpurin、替拉扎明、二氯环戊二烯钛、拓扑替康、topsentin、托瑞米芬、全能性干细胞因子、翻译抑制剂、维 A 酸、三乙酰尿苷、曲西瑞宾、曲麦克特、曲普瑞林、托烷司琼、美替甾醇、酪氨酸激酶抑制剂、tyrphostins、UBC 抑制剂、乌苯美司、尿殖窦 - 衍生生长抑制因子、尿激酶受体拮抗剂、伐普肽、变曲霉素 B、载体系统、红血球基因治疗、velaresol、veramine、verdins、verteporfin、长春瑞滨、vinoxaltine、vitaxin、伏氯唑、zanoterone、折尼铂、亚苄维和净司他丁 stimalamer。

[0088] X 也可以是抗增殖药剂，如吡曲克辛。任选地，X 是抗前列腺肥大药剂，如豆甾糖苷、良性前列腺肥大治疗药剂，如盐酸他索罗辛或前列腺生长抑制剂，如潘托。

[0089] X也可以是放射性物质,包括但不限于:纤维蛋白原¹²⁵I、氟脱氧葡萄糖¹⁸F、Fluorodopa¹⁸F、胰岛素¹²⁵I、胰岛素¹³¹I、Lobenguane¹²³I、Iodip 酰胺 Sodium¹³¹I、碘安替比林¹³¹I、碘胆固醇¹³¹I、碘马尿酸钠¹²³I、碘马尿酸钠¹²⁵I、碘马尿酸钠¹³¹I、Iodopyracet¹²⁵I、碘焦木(Iodopyracet)¹³¹I、盐酸lofetamine¹²³I、Iomethin¹²⁵I、Iomethin¹³¹I、Iothalamate Sodium¹²⁵I、Iothalamate Sodium¹³¹I、酪氨酸¹³¹I、碘甲腺原氨酸¹²⁵I、碘甲腺原氨酸¹³¹I、醋酸Merisoprol¹⁹⁷Hg、醋酸Merisoprol²⁰³Hg、Merisoprol¹⁹⁷Hg、硒甲硫氨酸⁷⁵Se、锝^{99m}Tc胶体三硫化二锑、锝^{99m}Tc Bicisate、锝^{99m}Tc Disofenin、锝^{99m}Tc Etidronate、锝^{99m}Tc Exametazime、锝^{99m}Tc Furifosmin、锝^{99m}Tc Gluceptate、锝^{99m}Tc Lidofenin、锝^{99m}Tc Mebrofenin、锝^{99m}Tc Medronate、锝^{99m}Tc Medronate Disodium、锝^{99m}Tc Mertiatide、锝^{99m}Tc Oxidronate、锝^{99m}Tc Pentetate、锝^{99m}Tc Pentetate Calcium Trisodium、锝^{99m}Tc Sestamibi、锝^{99m}Tc Siboroxime、锝^{99m}Tc、Succimer、锝^{99m}Tc Sulfur Colloid、锝^{99m}Tc Teboroxime、锝^{99m}Tc Tetrofosmin、锝^{99m}Tc Tiatide、甲状腺素¹²⁵I、甲状腺素¹³¹I、Tolpovidone¹³¹I、三油精¹²⁵I或三油精¹³¹I。

[0090] 其它适合用于本发明偶联物的治疗剂或细胞毒性剂包括,例如抗癌辅助增强药剂,包括但不限于:三环抗镇静药(如丙咪嗪、去甲丙咪嗪、氯米帕明、曲米帕明、凯舒、去甲替林、普罗替林、阿莫沙平、马普替标)、非环形抗镇静药(如珊特拉林、曲唑酮和西酞普兰)、Ca⁺⁺拮抗剂(如异搏定、硝苯地平、尼群地平和卡罗维林)、钙调蛋白抑制(甲基丁烯胺、三氟拉嗪和氯米帕明)、两性霉素B、三苯乙醇类似物(如三苯氧胺)、抗心律失常药物(如奎纳定)、抗高血压药物(如利血平)、硫醇消除剂(如buthionine和sulfoximine)及多药抗性减缓药物如Cremaphor EL。

[0091] 本发明偶联物可以与细胞因子如粒细胞集落刺激因子一起给药。在抗癌鸡尾酒中使用的优选抗癌药剂(如与本发明药剂联合使用)包括(其中某些药剂的MTD在圆括号中示出):吉西他滨(1000mg/m²)、氨甲喋呤(15mg/m² i. v. + 无色母体(leuco.) < 500mg/m² i. v. w/o 色母体)、5-FU(500mg/m²/d×5d)、FUDR(鼠100mg/kg×5、人0.6mg/kg/d i. a.)、FdUMP、羟基尿(对人而言为35mg/kg/d)、多西他塞(60-100mg/m²)、discodermolide、epothilones、长春新碱(1.4mg/m²)、长春碱(逐渐增加:3.3-11.1mg/m²很少增加到18.5mg/m²)、vinorelbine(30mg/m²/wk)、meta-pac、伊立替康(50-150mg/m², 1x/wk 根据病人的反应)、SN-38(比伊立替康效力强100倍)、10-羟基喜树碱、拓扑替康(人1.5mg/m²/d, 1 x iv Ldl0mice = 75mg/m²)、足叶乙甙(人100mg/m²)、阿霉素、flavopiridol、Cis-Pt(人100mg/m²) ;carbo-Pt(人360mg/m²) ;搏来霉素(20mg/m²)、丝裂霉素C(20mg/m²)、光神霉素(30sug/kg)、卡培他滨(口服2.5g/m²)、阿糖胞苷(100mg/m²/d)、2-CL-2`脱氧腺苷、氟尿苷-P04(25mg/m²/d, ×5d)、米托蒽醌(12-14mg/m²) ;米托唑胺(> 400mg/m²)、脱氧助间型霉素和雷替曲塞。

[0092] X可优选为抗代谢药,如氨甲喋呤。抗代谢药包括,但不限于下述物质及其衍生物:咪唑硫嘌呤、克拉曲滨、阿糖胞苷、氮烯咪胺、磷酸氟尿苷、氟二氧嘧啶、盐酸吉西他滨、巯基嘌呤、氨甲喋呤、mitobronitol、mitotane、氯胍、乙嘧啶、雷替曲塞、葡糖醛酸三甲曲沙、urethane、硫酸长春碱、硫酸长春新碱等。更优选地,X可以是叶酸类抗代谢药,包括,例如氨甲喋呤、氯胍氢氯化物、pyrimethanime、trimethoprim 或葡糖醛酸三甲曲沙以及这些化合物的衍生物。

[0093] 在其它实施方式中, X 也可以是蒽环族 (anthracycline family) 肿瘤试剂, 包括但不限于: 阿克拉霉素、daunorubicine chlorhydrate、doxorubicine chlorhydrate、表柔比星、伊达比星、吡柔比星或佐柔比星。此外, X 可以是喜树碱, 或其衍生物或相关化合物 10, 11- 亚甲基二氧喜树碱。X 可以是选自美登素 (maytansinoid) 族化合物, 其包括了不同结构的相关化合物。例如, 美坦西醇 P3、美登素 I、2'-N- 去甲美坦西醇或 maytanbicyclinol 是美登素 (maytansinoids)。

[0094] Y 是亲水性间隔序列, 优选是一种能增加偶联物的生物分布, 或者是亲水性聚合体。例如, Y 可以是能增加生物活性肽偶联物的亲水性生物分布的多肽序列。在优选实施方式中, Y 具有 $U(V-V)_n$ 的结构, 其中 U 是 D-Pro、L-Pro、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、肌氨酸、Lys、Orn、Dab、Dap、4-NH₂-Phe 或者 $(NH_2-(CH_2)_m-COOH)$, 其中 $m = 2-10$, 包括两端值, 或者缺失; 每一个 V 独立的选自: D-Ser、L-Ser、D-Thr、L-Thr、D-Gln、L-Gln、D-Asn、L-Asn、D-4-OH-Pro 或者 L-4 羟基 -Pro; 并且 $n = 1-50$, 包括两端值。在其它实施方式中每一个 V 独立选自 D-Ser 或者 L-Ser。另外的实施方式中, 至少一个 V 是 D- 氨基酸。

[0095] 根据此处的教导, Y 可以选择为能够辅助本发明偶联物的生物分布。Y 可以是肽或诸如 PEG 或 PVA 的聚合物。如果 Y 是亲水性肽, Y 长度优选为 1 至 50 个氨基酸, 或更优选为 3-15 个残基。例如, Y 的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基。当 Y 是肽时, 可以包含极性或非极性氨基酸, 以及它们的天然的、合成的或经修饰的类似物或衍生物。

[0096] Y 也可以是亲水性聚合物。例如, Y 可以是聚乙二醇 (PEG)、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇 (PVA)、N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺 (HPMA) 或 HPMA 共聚物、 α, β -聚(N-羟乙基)-DL-天冬酰胺 (PHEA) 或 α, β -聚(N-羟丙基)-DL-天冬酰胺。本发明偶联物中使用的 PEG、PHEA 和 PVA 基团也是已知非常好的刺激快速经肾分泌的促进剂, 但通常伴随着较低的潜在的药物毒性 (如参见 Yamoaka et al., J. Pharmacol. Sci., 83:601-606, 1994; Rypacek et al., Pflugers Arch., 392:211-217, 1982; Yamoaka et al., J. Pharm. Pharmacol., 47:479-486, 1995)。这些基团可促进来自生物可利用的、非内在偶联物的毒性的降低。

[0097] Z 作为接头肽, 当通过 Q 的末端或侧链氨基基团而结合到 Q 上时, 能够保持 Q 的至少 50% 生物活性。通常, Z 可以是具有 2、3、4 或 5 个残基的肽。Z 具有如下结构: A-B-C-E-F, 其中 A 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser 或 L-Ser, 或者缺失; B 是 D-Lys 或 D-Tyr, 或者缺失; C 是 Lys、Ser、hSer、Thr、Nle、Abu、Nva、(2, 3 或 4) 3- 吡啶 -Ala (Pal)、Orn、Dab、Dap、4-NH₂-Phe、D-4-OH-Pro 或 L-4-OH-Pro, 或者缺失; E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3- 碘 -D-Tyr、3-5- 二碘 (diido) -D-Tyr、3- 碲 -D-Tyr、3-5 碲 -D-Tyr、3- 溴 -D-Tyr、3-5- 二溴 -D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln; F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3- 碘 -D-Tyr、3-5 二碘 -D-Tyr、3- 碲 -D-Tyr、3-5 碲 -D-Tyr、3- 溴 -D-Tyr、3-5- 二溴 -D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln; 当 A、B、C 和 E 分别是 Tyr、Tyr、Lys 和 Tyr 时, 则 F 不能是 Lys; 当 A、B、C 和 E 分别是 Lys、Tyr、Lys 和 Tyr 时, 则 F 不能是 Tyr 或 Lys; 当 A 和 B 缺失时, 且 C 和 E 分别是 Lys 和 Tyr 时, 则 F 不能是 Tyr 或 Lys。

[0098] 在其它实施方式中, Z 具如下结构 (当 A、B 和 C 缺失时):

[0099] E-F

[0100] 其中 E 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-S 二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5 碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln；F 是 D-Lys、D-Tyr、D-Ser、L-Ser、D-4-OH-Pro、L-4-OH-Pro、3-碘-D-Tyr、3-5 二碘-D-Tyr、3-碲-D-Tyr、3-5 碲-D-Tyr、3-溴-D-Tyr、3-5-二溴-D-Tyr、D-Asn、L-Asn、D-Asp、L-Asp、D-Glu、L-Glu、D-Gln 或 L-Gln。

[0101] 在优选实施方式中，Z 是 D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO :1)、D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO :2)、D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr (SEQ ID NO :3)、D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :4)、D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO :5)、D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO :5)、D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :6)、D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :7)、D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :8)、Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO :9)、Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO :10)、Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO :10)、Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :11)、Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :12)、Pal-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO :13)、Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO :14)、D-Ser-D-Lys、D-Ser-D-Tyr、D-Lys-D-Lys、D-Lys-D-Tyr 或 D-Tyr-D-Lys。

[0102] Q 是靶向部分，如是生物活性肽。非免疫反应蛋白、多肽或肽配体可以用于形成本发明偶联物，其包括但不限于：转铁蛋白、表皮生长因子 (“EGF”)、铃蟾肽、胃泌激素、胃泌素释放肽、血小板源生长因子、IL-2、IL-6、肿瘤生长因子 (“TGF”)，如 TGF- α 和 TGF- β 、牛痘生长因子 (“VGF”)、胰岛素及胰岛素群生长因子 I 和 II。非肽配体可包括，如类固醇、碳水化合物、维生素和凝集素。

[0103] 在优选实施方式中，Q 是肽，如促生长素抑制素、促生长素抑制素类似物、铃蟾肽、铃蟾肽类似物或是抗体，如单克隆抗体。优选的生物活性肽或靶向部分经活性内化程序被选择性细胞所内化，如当结合到 G 蛋白偶联受体或生长激素 2 型受体 (SSTR2)。

[0104] 本发明偶联物通过包含 Z 基团而抑制毒性肽在组织中的积累 (或连接肽 (即肽末端延伸))，Z 基团包含亲水性残基，且可选地包含亲水性间隔序列。这些成分促进通过肾而快速清除完整的、未结合肽。

[0105] 当偶联到细胞毒性剂，本发明偶联物可设计成保持生物活性肽的全部生物潜能。本发明肽类似物具有的生物潜能优选地高于或等于相应母肽的潜能，即对目标的特异性高于、低于或等同于母肽。例如，促生长素抑制素类似物结合到促生长素抑制素受体亚型种类可比天然促生长素抑制素能够结合的要多，或者该类似物只能够结合到一个特定受体亚型。本发明的包含 D 异构体氨基酸或其类似物的一些类似物可促进细胞毒性剂的稳定偶联，而保持了肽类似物的受体高亲和性和生物活性。

[0106] 本发明的细胞毒性剂或治疗剂偶联物可采用任何已知能够识别促生长素抑制素受体的促生长素抑制素类似物，这在上面已有描述。优选地，偶联物中的促生长素抑制素类似物部分包括 10 至 18 个氨基酸，包括的核心序列为：环 [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys] (SEQ ID NO :37 和 SEQ ID NO :38)。优选地，类似物的 C 末端是 Thr-NH₂。此处所披露的铃蟾肽类似物可偶联到本发明肽剂中的细胞毒性剂或治疗剂上。

[0107] 细胞毒性剂或治疗剂靶标特性使得可以选择性破坏表达特异于生物活性肽的受体的肿瘤细胞。例如，表达特定促生长素抑制素受体的肿瘤细胞包括肺、乳房、前列腺、结肠、脑、胃肠道、神经内分泌轴、肝、肾等的肿瘤细胞 (参见 Schaer et al., Int. J. Cancer,

70 :530-537,1997 ;Chave et al. , Br. J. Cancer 82(1) :124-130,2000 ;Evans et al. , Br. J. Cancer 75(6) :798-803,1997)

[0108] 本发明偶联物中使用的肽包括KiSS肽和其类似物、硬骨鱼紧张肽II和其类似物、GnRH I和II及其类似物、奥曲肽、depreotide、vapreotide、血管活性肠肽(VIP)、缩胆囊肽(CCK)、胰岛素样生长因子(IGF)、含RGD的肽、黑素细胞激动激素(MSH)、神经降压素、降钙素、源自抗肿瘤抗体的互补决定区的肽、谷胱甘肽、YIGSR(白细胞亲合肽,如P483H,包含血小板因子-4(PF-4)的肝素结合区和富含赖氨酸序列)、心房利钠肽(ANP)、 β -淀粉样肽、 δ -阿片拮抗剂(如ITIPP(psi))、膜联蛋白-V、内皮素、白细胞介素(IL)-1、IL-1ra、IL-2和IL-8、白三烯B4(LTB4)、趋化肽(如N-甲酸-甲硫氨酰-亮氨酸-苯基丙氨酸-赖氨酸(fMLFK))、GP Iib/IIIa受体拮抗肽(如DMP444)、表皮生长因子、人嗜中性弹性蛋白酶抑制剂(如EPI-HNE-2和EPI-HNE-4)、血浆酶抑制剂、抗菌肽、apricide(如P280和P274)、血小板反应蛋白受体(包括其类似物如TP-1300)、bitistatin、I型垂体腺苷酰环化酶受体(PAC1)、纤维蛋白 α -链、以及它们的衍生物和类似物。也包括那些来自噬菌体展示文库的肽及其经保守性取代获得的肽,其靶向哺乳动物体内的细胞或组织(如发病组织,如肿瘤或增殖性血管,如参见Aina et al. , Biopolymers 66 :184-199,2002)。此外,还包括上述肽的衍生物和类似物。参见Signore et al. , Eur. J. Nucl. Med. 28(10) :1555-65,2001

[0109] 细胞毒性促生长素抑制素类似物也可以是特异于脉管系统肿瘤或血管发生血管,如那些过量表达促生长素抑制素受体(参见Denzler and Reubi, Cancer 85 :188-198,1999 ;Gulec et al. , J. Surg. Res. 97(2) :131-137,2001 ;Woltering et al. , J. Surg. Res. 50 :245,1991)。此外,由于本发明优选的促生长素抑制素类似物具有不同的亲水性,它们是水溶性的,因而相对于以前使用的疏水性类似物而言其效果增强了。此处所描述的亲水性类似物可溶于血液、脑脊髓液和其它体液,以及尿液,能促进肾的排泄。这种亲水特性有助于本发明类似物传递到身体的几乎所有部分。本发明揭示了整合到肽类似物的特异性亲水性成分,以根据不同的被偶联细胞毒性剂的化学和结构特点来调整类似物的亲水性。

[0110] 促生长素抑制素激动剂类似物在结合到它们的受体上后很快被内化(如参见Lukinius et al, Acta Onc. ,38 :383-387,1999),因而可以用作携带不同靶向治疗剂的载体-如传统的肿瘤细胞毒性剂。由于许多肿瘤类型高度过量表达促生长素抑制素类型2受体,因此这种抗肿瘤剂的特异性被显著改善成为可能。在这种方式中,我们预计只要能够设计出一种仍保持非常高的对促生长素抑制素受体的亲和性的杂交分子,所有可偶联的细胞毒性剂相关的毒副作用能被有效地降低。

[0111] 在本发明中,免疫反应配体用作靶向部分包括抗原识别免疫球蛋白(也称为“抗体”)或其抗原识别片段。特别优选地免疫球蛋白是那些可以识别肿瘤相关抗原。在此处,“免疫球蛋白”指任何已知的免疫球蛋白类或亚类,如IgG、IgA、IgM、IgD或IgE。优选的免疫球蛋白属于IgG种类。也可以是任何来源的免疫球蛋白。然而,优选地,免疫球蛋白来源于人、小鼠或兔。此外,免疫球蛋白可以是多克隆或单克隆抗体,但优选为单克隆抗体。

[0112] 本发明偶联物可包括识别抗原的免疫球蛋白片段。这种片段如可包括Fab'、F(ab')₂、Fv或Fab片段、或其它抗原识别免疫球蛋白片段。例如可经蛋白水解,如通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化,也可经还原烷化及多种技术联合来制备这种免疫球蛋白片段。制备这种免疫球蛋白片段的材料和方法在本领域中是熟知的。参见Parham, J. Immunology,

131,2895,1983 ;Lamoyi et al. , J. Immunological Methods, 56, 235, 1983。

[0113] 本发明偶联中使用的免疫球蛋白可以是“嵌合抗体”，该术语在本领域共知的。而且，免疫球蛋白可以是“双功能”或“杂交”抗体，即该抗体的一个臂特异于抗原决定位点，如肿瘤相关抗原，而其它的臂识别不同的靶标，如半抗原可结合对抗原携带肿瘤细胞致死的药剂，也可被该药剂结合。任选地，双功能抗体的每一个臂特异于将要治疗或进行生物修饰的肿瘤相关抗原的不同抗原决定区。杂交抗体因此具有双重特异性，优选地对选择的半抗原具有一或多个特异性结合位点或对靶标抗原具有一或多个特异性结合位点，如肿瘤、被感染生物或其它疾病状态相关的抗原。

[0114] 生物双功能抗体如欧洲专利公开 EPA 0 105 360 中描述的，在此将其全文引入作为参考。这种杂交或双功能抗体可以是生物来源的、也可以通过细胞融合或化学方法获得的，如用交联剂或经双硫桥形成的试剂，可以包含整个抗体和 / 或其片段。获得这种杂交抗体的方法如披露于 1983 年 10 月 27 日公开的 PCT 申请 W083/03679、1987 年 4 月 8 日公开的欧洲专利申请 EPA 0 217 577，每一篇的全部内容均引入本申请作为参考。尤其优选的双功能抗体是从“polydome”或“quadrome”通过生物方法制备的、或通过交联剂如双-(马来酰亚胺)-甲基醚 (“BMME”) 或其它本领域熟知的交联剂而制备的。

[0115] 此外，免疫球蛋白可以是单链抗体 (“SCA”)。SCA 可由单链 Fv 片段 (“scFv”) 组成，其中可变的轻 (“V_L”) 和重 (“V_H”) 结构域通过肽桥或双硫键连接。免疫球蛋白可由具有抗原结合活性的单个 V_H(dAbs) 组成。参见 Winter and C. Milstein, Nature 349 : 295, 1991 ; R. Glockshuber et AL. , Biochemistry 29 : 1362, 1990 ; and, E. S. Ward et al. , Nature 341 : 544, 1989。

[0116] 本发明特别优选使用的是嵌合单克隆抗体；优选的是那些特异于肿瘤相关抗原的嵌合抗体。此处，“嵌合抗体”指包括一个可变区即结合区和至少一个恒定区部分的单克隆抗体，其中可变区和恒定区来源不同或来自不同种的生物，通常通过重组 DNA 技术来制备。具有鼠抗体的可变区和人抗体的恒定的嵌合抗体在本发明的某些方面的应用中特别优选，尤其在用于人类治疗中。这是因为这种抗体制备容易，且具有较纯鼠单克隆抗体要低的免疫源性。这种鼠 / 人嵌合抗体由包含编码鼠免疫球蛋白可变区和编码人免疫球蛋白恒定区的 DNA 的免疫球蛋白基因表达产生。本发明偶联物中使用的其它形式嵌合抗体是对原始抗体进行修饰或改变成另外类别或亚类的抗体。这种“嵌合”抗体也称为“类别改变抗体”。产生这种嵌合体的方法包括本领域熟知的常规重组 DNA 和基因转染技术。参见 Morrison, S. L, et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. , 81 : 6851, 1984。

[0117] 术语“嵌合抗体”也包括“人源化抗体”，即相对于原始免疫球蛋白，将其框架或“互补决定区” (“CDR”) 改变成包括不同特异性的免疫球蛋白的 CDR。在优选实施方式中，鼠的 CDR 嫁接到人抗体的框架中而制备成“人源化抗体”，参见 L. Riechmann et al. , Nature 332 : 323, 1988 ; M. S. Neuberger et AL. , Nature 314 : 268, 1985。尤其优选的 CDR 相应于那些上面提到的识别抗原的嵌合和双功能抗体的代表序列。参见 EPA 0 239 400 (公开于 1987 年 9 月 30 日)，将其全文引入本申请作为参考。

[0118] 本领域技术人员能够意识到制备具有嵌合或人源化抗体的低免疫反应性和双功能抗体的适应性 (尤其对于治疗而言) 的双功能 - 嵌合抗体。这种双功能 - 嵌合抗体可通过上述的合成方法诸如化学合成，如利用交联剂和 / 或重组方法来制备。本发明不应限制

于产生抗体的任何特定方法的范围之内,所述抗体不管是双功能、嵌合、双功能-嵌合、人源化或抗原识别片段或其衍生物。

[0119] 本发明偶联物也可包括免疫球蛋白(如上所定义)或免疫球蛋白片段融合了活性蛋白,如公开于1986年3月13日的Neuberger等,PCT申请W086/01533中描述的各种酶类。在此将该文献全文引入作为参考。

[0120] 此处,“双功能”、“融合”、“嵌合”(包括人源化)和“双功能-嵌合”(包括人源化的)抗体也可解释为包括它们本身文字含义,也解释为包括抗原识别片段。本领域技术人员知晓这种片段可以通过对完整的双功能、嵌合、人源化或嵌合-双功能抗体进行常规的酶切而制备。如果完整抗体对这种酶切不敏感,如由于结构特性所致,则可用免疫球蛋白片段作为起始物质;或者,如果利用的是重组技术,DNA序列本身可被剪切成编码预期的“片段”,则当它表达时可在体内或体外通过化学或生物手段制备最终预期的完整免疫球蛋白“片段”。本申请中使用的就是在这句话中的术语“片段”。

[0121] 本发明使用的免疫球蛋白(抗体)或其片段可以本质上是多克隆或单克隆抗体。单克隆抗体是优选的免疫球蛋白。制备多克隆或单克隆的技术是本领域熟知的。如参见G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495, 1975。此外,杂种瘤和/或单克隆抗体可通过如此的杂交瘤产生,且本发明中实际使用的抗体公众可以获得。

[0122] 在进一步的实施方式中,本发明涉及治疗疾病或修饰生物功能的方法。该方法包括给予温血动物以治疗有效量或生物功能修饰有效量的本发明偶联物。本领域技术人员知晓特定偶联物的使用可根据所治疗疾病的病情或修饰的生物体系而定。特别地,本领域技术人员可选择特定靶向分子和细胞毒性剂或治疗剂,将其制备成的本发明偶联物能够特异性地治疗相应疾病或修饰目标生物功能。可以预想多种疾病能够用本发明偶联物进行治疗,包括如肺癌、乳癌、脑癌、眼癌、前列腺癌或结肠癌;神经内分泌起源的癌症(如类癌综合症);诸如与肿瘤、视网膜黄斑病变或糖尿病性视网膜病相关的那些增殖性血管发生(如在眼中)。

[0123] 本发明的偶联物可以直接或与任何药物可接受载体或已知的盐组合而给予哺乳动物患者,如人。药物可接受盐包括药物工业中通常使用的非毒性酸盐或金属复合物。酸盐的实例包括有机酸如乙酸、乳酸、pamoic、maleic、柠檬酸、苹果酸、维生素C、琥珀酸、benzoic、palmitic、suberic、水杨酸、酒石酸、甲烷磺酸(methanesulfonic)、甲苯磺酸或三氟乙酸等;聚合酸,如丹宁酸、羧甲基纤维素等;无机酸,如盐酸、氢溴酸、硫磺酸、磷酸等。有效的药物可接受载体是生理盐水。其它生理上可接受载体和其剂型是本领域技术人员非常熟知的,也可见于如Remington's *Pharmaceutical Sciences*, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA。

[0124] 本发明偶联物的治疗有效量的药物剂型、或其药物可接受盐可口服、胃肠外给药(如经肌肉、腹膜、静脉、皮下或眼注射、吸入、皮内、滴眼或灌输)、经鼻、阴道、直肠、舌下或体表,与适合于给药途径的药物可接受载体混合一起给药。

[0125] 制备剂型的方法在本领域中是熟知的,可见于如Remington's *Pharmaceutical Sciences* (1th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA。用于口服的组合物根据生产药物组合物的已知方法而制成固体或液体形式。组合物可选地包含甜味剂、调味剂、着色剂、香味剂和/或保鲜剂以提供更美味的制剂。用于口服给药的固

体剂量形式包括胶囊、片剂、药丸、粉剂和颗粒。在这些固体剂型中，活性成分至少与一种惰性药物可接受载体或赋形剂混合。也可使用例如，惰性稀释液，如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、蔗糖、淀粉、磷酸钙、磷酸钠或高岭土。粘合剂、缓冲剂和 / 或润滑剂（如硬脂酸镁）。片剂和药丸可制备成包有肠溶衣的形式。

[0126] 用于口服的液体剂量形式包括药物可接受乳液、溶液、悬浮液、糖浆和软胶囊。这些剂型包括本领域中常用的惰性稀释剂，如水或油介质。除这些惰性稀释剂之外，组合物也可包括助剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂。

[0127] 胃肠外给药的剂型包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液或乳液。适合介质的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油、明胶、氢化 naphthalenes 和可注射有机酯，如乙烷基油酸乙基油酸 (ethyl oleate)。这些剂型也可包含助剂，如保持剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。生物适合的、生物降解的丙交酯多聚物、丙交酯 / 乙交酯共聚物或聚氧乙烯 / 聚丙烯共聚物可用于控制化合物的释放。其它可选有用的胃肠外给药体系包括乙烯 - 乙烯醋酸共聚物颗粒、渗透剂、可移植灌输体系和脂质体。

[0128] 液体剂型可通过如微孔滤膜去除细菌、或在组合物中加入灭菌剂、或辐射或加热组合物以进行灭菌。任选地，剂型也制备成在使用前溶于灭菌水或其它无菌注射介质的无菌、固体组合物的形式。

[0129] 用于经直肠或阴道给药的组合物优选为除活性物质之外包含赋形剂，如可可油或栓剂蜡的栓剂。用于经鼻或舌下给药的组合物可根据标准方法来制备。用于吸入法的剂型可包含赋形剂，如乳糖，且可以是含如聚氧乙烯 -9- 月桂醚、甘氨酸盐和脱氧胆脂的水溶性溶液，也可以是适于滴鼻或喷雾的油状溶液，或者是凝胶形式。

[0130] 本发明组合物中的活性成分的量也可变化。本领域技术人员知晓根据不同的因素来调整单个的剂量，这些因素包括给予的多肽、给药的时间、给药的途径、剂型的特性、排泄率、患者的状况及其年龄、体重、健康状况和患者的性别。此外，生物活性肽如促生长素抑制素或铃蟾肽所针对的靶标的严重程度也对剂量水平产生较大影响。通常，剂量为每天给予 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重，可作为一次剂量或分开为多次剂量。优选地，常用的剂量范围每天为 $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 体重。所需剂量变化范围可根据不同给药途径的不同效率而有较大变化。例如，口服通常比静脉注射要求更高的剂量水平。在本领域中熟知，可以根据标准的最佳化途径对剂量进行变化。通常，精确的药物有效剂量在主治医师考虑到上述因素来决定。

[0131] 本发明偶联物可以通过持续释放组合物剂型施用，如在 U. S. P. N. 5, 672, 659 和 U. S. P. N. 5, 595, 760 中所描述的。使用即时或持续释放的组合物有赖于被治疗的疾病类型。如果是急性或超急性疾病，选择即时释放剂型要比延迟释放剂型要好。任选地，为了预防或长期治疗，持续释放组合物通常是优选的。

[0132] 本发明使用的多肽可用任何合适的方式进行制备。可从自然来源分离得到、也可重组产生或者化学合成或结合使用这些技术来获得多肽。短肽的合成在本领域中是熟知的。参见 Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 2d ed., 1984)。本发明的多肽可根据熟知的标准肽合成方法进行合成得到。

[0133] 下面的实施例意在阐释本发明。它们不以任何方式来限制本发明。

[0134] 实施例 1

[0135] 喜树碱氨甲酸酯的制备

[0136] 取喜树碱 (250mg) 和 4-二甲氨基嘧啶 (DMAP, 50mg) 悬浮于 3ml 无水嘧啶和 50ml 无水二氯甲烷中。加入光气 (20% 甲苯溶液, 750 μ l) 到上述浆液中, 并在室温下混合 2 小时。多余的光气和二氯甲烷在化学通风橱中蒸发去除, 后将喜树碱氯甲酸酯溶于 DCM 中。

[0137] 实施例 2

[0138] 喜树碱-羰基-N-氨基乙基-丙氨酸-D-叔丁基-Ser-Nle-D-叔丁基-Tyr-D-叔丁基-Ser-S-三苯甲基-Cys-Phe-D-Trp- ϵ -叔丁氧基羰基-Lys-叔丁基-Thr-S-三苯甲基-Cys-叔丁基-Thr-Rink-酰胺-树脂 (SEQ ID NO:16) 的制备

[0139] 将 Rink 酰胺 [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨甲基)苯氧基乙酰氨基-正亮氨酸-甲基二苯甲基胺树脂 (0.063mmol), 100-200 目 (Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中, 并在二甲基甲酰胺 (DMF) 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂, 加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 (2min)。过滤树脂, 再加入过量 20% 哌啶并混合 (20min) 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后, 用 DMF 洗涤树脂 4 次, 因而第一保护氨基基团: Fmoc-Thr (tBut) (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中, 并加入到树脂中混合 1 小时, 继而 DMF 洗涤 4 次。

[0140] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理, 再次去除 Fmoc 基团, 接着通过大体相同的偶联过程, 下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应: Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-t-丁基-L-苏氨酸、N^q-Fmoc-N^e-Boc-L-赖氨酸、N^q-Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-D-色氨酸、Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-三苯甲基-D-丝氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-酪氨酸、N^q-Fmoc-正亮氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽基树脂上 (3eq) 时, 加入存在于 N-甲基- α -吡咯烷酮 (NMP) 中的 N-Boc-乙二胺, 并混合 (2h), 然后用 DMF 洗涤 3 次, 再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中, 混合过夜, 并用大量的 DMF 洗涤, 进而用甲醇洗涤。最后过滤后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0141] 实施例 3

[0142] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-环 [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-酰胺 (SEQ ID NO:17) 的制备

[0143] 实施例 2 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中, 加入含水 (2.5%)、1,2-乙二硫醇 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 (2h)、过滤并用 TFA 洗涤几次。用 IRA 真空蒸发掉 TFA, 加入乙醚到所获得的油中, 得到黄色粉末, 然后溶于 60% 醋酸 (250mL) 中。逐滴加入甲醇中的碘浓缩液于粉末中, 同时剧烈振动直到染成永久的褐色, 而过量的碘通过加入少量的维生素 C 来去除。

[0144] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL, 则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化, 采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4 \times 250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱: 由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 80% MeCN 中的 0.1% TFA 的缓冲液 B; 以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证, 将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩, 最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末, 在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质

辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0145] 实施例 4

[0146] 紫杉醇氯甲酸酯的制备

[0147] 取紫杉醇 (0.6mmol) 在圆底 (RB) 烧瓶中溶解于 30mL 无水 DCM。在干氮环境、0°C 条件下, 20 分钟或更长时间内向其中加入溶解在 20mL 无水 DCM 中的二异丙基乙胺 (DIEA; 3mmol)。再向浆液中加入光气 (3mmol), 于 0°C 条件下混合 30 分钟, 于室温下 2 小时。过量光气和二氯甲烷蒸发去除, 将紫杉醇氯甲酸酯溶解于二氯甲烷。

[0148] 实施例 5

[0149] 紫杉醇-羰基-N-(2-羟乙基)-丙氨酸-D-三苯甲基-Ser-正亮氨酸-D-三苯甲基-Tyr-D-三苯甲基-Ser-S-三苯甲基-Cys-Phe-D-Tip-ε-mtt-Lys-三苯甲基-Thr-S-三苯甲基-Cys-三苯甲基-Thr-氨基-咕吨-MBHA-树脂 (SEQ ID NO:16) 的制备

[0150] Fmoc-氨基-Xanthen-MBHA(4-甲基二苯甲基胺盐酸盐) 聚苯乙烯树脂 (0.063mmol) [Bachem, catalog # D-2040, Lot # 0541173] 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中, 并于 DMF 中膨胀约 1 小时。过滤树脂, 加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂, 再加入过量的 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后, 用 DMF 洗涤树脂 4 次, 因而第一保护的氨基酸、Fmoc-Thr(三苯甲基) (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中, 并加入到树脂中混合 1 小时, 继而后用 DMF 洗涤 4 次。

[0151] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理, 再次去除 Fmoc 基团, 接着通过大体相同的偶联过程, 下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应: Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-三苯甲基-L-苏氨酸、N^ε-Fmoc-N^ε-mtt-L-赖氨酸、N^ε-Fmoc-D-色氨酸、Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-三苯甲基-D-丝氨酸、Fmoc-O-三苯甲基-D-酪氨酸、N^ε-Fmoc-正亮氨酸、Fmoc-O-三苯甲基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽基树脂上时, (3eq) 乙醇胺加入到 NMP, 并混合 2h, 然后用 DMF 洗涤 3 次, 再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 4 制备的紫杉醇氯甲酸酯加入到树脂中, 混合过夜, 并用大量的 DMF 洗涤, 进而用甲醇洗涤。最后将衍生树脂进行空气干燥过夜。

[0152] 实施例 6

[0153] 紫杉醇-羰基-N-(2-羟乙基)-甘氨酸-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-SER-环 [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-酰胺 (SEQ ID NO:17) 的制备

[0154] 实施例 5 制备的紫杉醇-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中, 加入三氟乙酸 (2%) 的二氯甲烷溶液 15mL。搅动悬浮液 (2h)、过滤并用二氯甲烷洗涤几次。真空蒸发掉二氯甲烷, 加入乙醚到所获得的油中, 得到白色粉末然后溶于 60% 醋酸 (250mL) 中。逐滴加入甲醇中的碘浓缩液于粉末中, 同时剧烈振动直到染成永久的褐色, 而过量的碘通过加入少量的维生素 C 来去除。

[0155] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL, 则粗的紫杉醇-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化, 采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱: 由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA 在 80% MeCN 中为缓冲液 B; 以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监

测。用 HPLC 分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的白色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0156] 实施例 7

[0157] 喜树碱-羰基-N-氨基乙基-丙氨酸-D-叔丁基-Ser-ε-叔丁氧基羰基-Lys-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-三苯甲基-His-Phe-Nle-Rink-氨基-树脂 (SEQ ID NO: 18) 的制备

[0158] 将 Rink 酰胺 MBHA 聚苯乙烯树脂 (0.063mmol) [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨甲基)苯氧基乙酰氨基-正亮氨酸基-甲基二苯甲基胺树脂,100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中,并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂,加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 (2min)。过滤树脂,再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后,用 DMF 洗涤树脂 4 次,因而第一保护的氨基酸、Fmoc-正亮氨酸 (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中,并加入到树脂中混合 1 小时,继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0159] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,接着通过大体相同的偶联过程,下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应:Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-Nⁱⁿ-三苯甲基-L-组氨酸、Fmoc-βAla、Fmoc-缬氨酸、Fmoc-丙氨酸、Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-L-色氨酸、Fmoc-谷氨酸、Fmoc-N^e-Boc-D-赖氨酸、Fmoc-O-t-丁基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽基树脂上时,(3eq)N-Boc-乙二胺加入到 NMP,并混合 2h,然后用 DMF 洗涤 3 次,再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的 DMF 洗涤,进而用甲醇洗涤。最后过滤后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0160] 实施例 8

[0161] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-D-Ser-D-Lys-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-His-Phe-Nle-酰胺 (SEQ ID NO: 18)

[0162] 实施例 7 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中,加入含水 (2.5%)、1,2-乙二硫醇 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 (2h)、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA,加入乙醚到所获得的油中,得到黄色粉末然后溶于 60% 醋酸 (250mL) 中。

[0163] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL,则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化,采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱:由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA 的 80% MeCN 为缓冲液 B;以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0164] 实施例 9

[0165] 喜树碱-羰基-N-氨基乙基-丙氨酸-D-叔丁基-Ser-D-叔丁基-Tyr-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-三苯甲基-His-Phe-Nle-Rink-酰胺-树脂 (SEQ ID NO: 18)

19) 的制备

[0166] 将 Rink 酰胺 MBHA 聚苯乙烯树脂 (0.063mmol) [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨甲基)苯氧基乙酰胺-正亮氨酸-甲基二苯甲基树脂, 100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中, 并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂, 加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂, 再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后, 用 DMF 洗涤树脂 4 次, 因而第一保护的氨基酸、Fmoc-正亮氨酸 (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中, 并加入到树脂中混合 1 小时, 继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0167] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理, 再次去除 Fmoc 基团, 接着通过大体相同的偶联过程, 下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应: Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-N^{im}-三苯甲基-L-组氨酸、Fmoc-β Ala、Fmoc-缬氨酸、Fmoc-丙氨酸、Fmoc-N^{im}-Boc-L-色氨酸、Fmoc-谷氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-Tyr、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽基树脂上时, (3eq) N-Boc-乙二胺加入到 NMP, 并混合 2h, 然后用 DMF 洗涤 3 次, 再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中, 混合过夜, 并用大量的 DMF 洗涤, 进而用甲醇洗涤。最后过滤后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0168] 实施例 10

[0169] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-D-Ser-D-Tyr-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-His-Phe-Nle-酰胺 (SEQ ID NO:19)

[0170] 实施例 9 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中, 加入含水 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 (2h)、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA, 加入乙醚到所获得的油中, 得到黄色粉末然后溶于 60% 醋酸 (250mL) 中。

[0171] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL, 则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化, 采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱: 由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA 的 80% MeCN 为缓冲液 B; 以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证, 将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩, 最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末, 在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0172] 实施例 11

[0173] Combretastatin-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-D-叔丁基-Ser-正亮氨酸-D-叔丁基-Tyr-D-叔丁基-Ser-S-三苯甲基-Cys-Phe-D-Trp-ε-叔丁氧基羰基-Lys-叔丁基-Thr-S-三苯甲基-Cys-叔丁基-Thr-Rink-酰胺-树脂 (SEQ ID NO:39)

[0174] 将 Rink 酰胺 MBHA 聚苯乙烯树脂 (0.063mmol) [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨甲基)苯氧基乙酰胺-正亮氨酸-甲基二苯甲基胺树脂, 100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中, 并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂, 加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂, 再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的

Fmoc 基团。去保护之后,用 DMF 洗涤树脂 4 次,因而第一保护的氨基酸、Fmoc-Thr (tBut) (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBT) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中,并加入到树脂中混合 1 小时,继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0175] 再用 20%哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,接着通过大体相同的偶联过程,下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应:Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-叔丁基-L-苏氨酸、N^ε-Fmoc-N^ε-Boc-L-赖氨酸、N^α-Fmoc-N^{inh}-Boc-D-色氨酸、Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-酪氨酸、N^ε-Fmoc-正亮氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽基树脂 (3eq) 上时,N-Boc-乙二胺加入到 NMP,并混合 (2h),然后用 DMF 洗涤 3 次,再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的 Combretastatin 氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的 DMF 洗涤,进而用甲醇洗涤。最后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0176] 实施例 12

[0177] Combretastatin-羧基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-环[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-酰胺 (SEQ ID NO:40) 的制备

[0178] 实施例 11 制备的 Combretastatin-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中,加入含水 (2.5%)、2-乙二硫醇 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 (2h)、过滤并用 TFA 洗涤几次。用 IRA 真空蒸发掉 TFA,加入乙醚到所获得的油中,得到黄色粉末然后溶于 60%醋酸 (250mL) 中。逐滴加入甲醇中的碘浓缩液于粉末中,同时剧烈振动直到染成永久的褐色,而过量的碘通过加入少量的维生素 C 来去除。

[0179] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL,则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化,采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱:由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA in 80% MeCN 为缓冲液 B;以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的白色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0180] 实施例 13

[0181] 喜树碱-羧基-N-(N-甲基-氨基乙基)-丙氨酸-D-叔丁基-Ser-正亮氨酸-D-叔丁基-Tyr-D-叔丁基-Ser-S-三苯甲基-Cys-Phe-D-Trp-ε-叔丁氧基羧基-Lys-叔丁基-Thr-S-三苯甲基-Cys-叔丁基-Thr-Rink-酰胺-树脂 (SEQ ID NO:39)

[0182] 将 Rink 酰胺 MBHA 聚苯乙烯树脂 (0.063mmol) [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨基)苯氧基乙酰胺-正亮氨酸-甲基二苯甲基胺树脂,100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中,并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂,加入过量的 20%哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂,再加入过量 20%哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后,用 DMF 洗涤树脂 4 次,因而第一保护氨基基团:Fmoc-Thr (tBut) (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBT) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF 中,并加入到树脂中混合 1 小时,继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0183] 再用 20%哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,接着通过大体相同的偶联过

程,下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应:Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-叔丁基-L-苏氨酸、N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-赖氨酸、N^α-Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-D-色氨酸、Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-酪氨酸、N^α-Fmoc-正亮氨酸、Fmoc-O-叔丁基-D-丝氨酸、溴乙酸。当溴乙酸全部偶联到肽树脂(3eq)上时,N-Boc-N-乙二胺加入到NMP,并混合2h,然后用DMF洗涤3次,再用DCM洗涤3次。实施例1制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的DMF洗涤,进而用甲醇洗涤。最后将过滤后的衍生树脂空气干燥过夜。

[0184] 实施例 14

[0185] 喜树碱-羰基-N-(N-甲基-氨基乙基)-丙氨酸-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-环[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-酰胺(SEQ ID NO:40)的制备

[0186] 实施例13制备的喜树碱-肽树脂(0.063mmol)置于圆底烧瓶中,加入含水(2.5%)、1,2-乙二硫醇(2.5%)和三异丙基甲硅烷(1%)的三氟乙酸(TFA)溶液15mL。搅动悬浮液(2h)、过滤并用TFA洗涤几次。用IRA真空蒸发掉TFA,加入乙醚到所获得的油中,得到黄色粉末然后溶于60%醋酸(250mL)中。逐滴加入甲醇中的碘浓缩液于粉末中,同时剧烈振动直到染成永久的褐色,而过量的碘通过加入少量的维生素C来去除。

[0187] 在真空中将溶液浓缩到约10mL,则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱(RP-HPLC)进行纯化,采用C-18结合的二氧化硅柱子(21.4×250mm)(Dynamax 300,8μM)。以20mL/min的流速进行线性梯度洗脱:由0.1%TFA组成的缓冲液A和0.1%TFA in 80%MeCN为缓冲液B;以每分钟1%递增而将B由20%上升至50%。分离液于280nm进行监测。用HPLC分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的白色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助(matrix assisted)激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0188] 实施例 15

[0189] 二叔丁氧基羰基-His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-叔丁氧基羰基-Trp-叔丁基-Tyr-Pro-Gln-Ile-叔丁基-Ser-N-e-喜树碱-羰基-N-(N-2-氨基乙基)-丙氨酸-Lys-叔丁基-Ser-Rink-酰胺-树脂(SEQ ID NO:20)

[0190] 将Rink酰胺MBHA聚苯乙烯树脂(0.063mmol),100-200目,Novabiochem, San Diego, CA)加入到CS136肽自动合成仪(CS Bio, Inc., San Carlos, CA)的反应器中,并在DMF存在下膨胀大约1小时。过滤树脂,加入过量的20%哌啶的DMF溶液并混合2min。过滤树脂,再加入过量20%哌啶并混合20min以保证去除树脂中的Fmoc基团。去保护之后,用DMF洗涤树脂4次,因而第一保护氨基基团:Fmoc-丝氨酸(tBut)(0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺(DIC)(0.188mmol)和N-羟基苯并三唑一水合物(HOBt)(0.188mmol)全部溶解于DMF中,并加入到树脂中混合1小时,继而用DMF洗涤4次。

[0191] 再用20%哌啶/DMF溶液处理,再次去除Fmoc基团,接着通过大体相同的偶联过程,下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应:Fmoc-N-e-1(4,4-二甲基-2,6-二氧化环己-1-亚基)3-3-甲基-丁基-L-赖氨酸、Fmoc-o-t-丁基-L-丝氨酸、NA-Fmoc-L-异亮氨酸、N-Fmoc-L-谷氨酸、N-Fmoc-L-脯氨酸、N-Fmoc-O-三苯甲基-L-酪氨酸、N^α-Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-L-色氨酸、N-Fmoc-L-脯氨酸、N-Fmoc-L-谷氨酸、N^α-Fmoc-L-异亮氨酸、N-Fmoc-L-谷氨酸、N^α-Fmoc-亮氨酸、Boc-O-T-丁基-L-组氨酸。

[0192] 然后用 2% 水合肼的 DMF 溶液处理保护肽树脂 3 次, 以去除赖氨酸残基上的 N-e-1-(4,4-二甲基-2,6-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基-丁基(ivDde)。自由 e-氨基基团然后偶联到溴乙酸全部偶联到肽基树脂(3eq)上时,N-Boc-N-乙二胺加入到 NMP, 并混合 2h, 然后用 DMF 洗涤 3 次, 再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中, 混合过夜, 并用大量的 DMF 洗涤, 进而用甲醇洗涤。最后过滤后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0193] 实施例 16

[0194] 噬菌体肽 p147 的喜树碱衍生物: His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-Trp-Tyr-Pro-Gln-Ile-Ser-N-e-喜树碱-羰基-N-(N-2-氨基乙基)-丙氨酸-Lys-Ser-环-NH₂(SEQ ID NO: 20) 的制备

[0195] 实施例 15 制备的喜树碱-肽树脂(0.063mmol)置于圆底烧瓶中, 加入含水(2.5%)、1,2-乙二硫醇(2.5%)和三异丙基甲硅烷(1%)的三氟乙酸(TFA)溶液 15mL。搅动悬浮液(5h)、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA, 加入乙醚到所获得的油中, 得到黄色粉末, 用制备反相高压液相色谱(RP-HPLC)进行纯化, 采用 C-18 结合的二氧化硅柱子(21.4×250mm)(Dynamax 300, 8 μM)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱: 由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA in 80% MeCN 为缓冲液 B; 以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证, 将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩, 最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末, 在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助(matrix assisted)激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0196] 实施例 17

[0197] O-t-丁基-D, L-丝氨酸的 N-羧基酐(carboxyanhydride)的制备

[0198] O-t-丁基-D-丝氨酸(0.0062mol)和 O-叔丁基-L-丝氨酸(0.0062mol)在氮气环境下悬浮于 55ml 无水四氢呋喃中。向悬浮液中加入光气(0.025mol), 并将悬浮液回流 15 分钟。溶剂和过量的光气蒸发后, 获得的油溶于加有 10ml THF 中, 后加入到 600ml 己烷并于 -20°C 结晶。

[0199] 实施例 18

[0200] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-[D 或 L-O-叔丁基-Ser]₋₁₅-D-叔丁基-Ser-正亮氨酸-D-叔丁基-Tyr-D-叔丁基-Ser-S-三苯甲基-Cys-Phe-D-Trp-ε-叔-丁酯氧羰基-Lys-叔丁基-Thr-S-三苯甲基-Cys-叔丁基-Thr-Rink-酰胺-树脂(SEQ ID NO: 21, 及 SEQ ID NO: 23-SEQ ID NO 36)

[0201] 将 Rink 酰胺 MBHA 聚苯乙烯树脂(0.063mmol)[4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨基)苯氧基乙酰胺-正亮氨酸-甲基二苯甲基胺树脂, 100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪(CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中, 并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂, 加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合(2min)。过滤树脂, 再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后, 用 DMF 洗涤树脂 4 次, 因而第一保护氨基基团: Fmoc-Thr(tBut)(0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺(DIC)(0.188mmol)和 N-羟基苯并三唑一水合物(HOBt)(0.188mmol)全部溶解于 DMF 中, 并加入到树脂中混合 1 小时, 继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0202] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,接着通过大体相同的偶联过程,下述氨基酸成功地与延长的肽链进行反应:Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-t-丁基-L-苏氨酸、N^q-Fmoc-N^e-Boc-L-赖氨酸、N^q-Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-D-色氨酸、Fmoc-L-苯基丙氨酸、Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸、Fmoc-O-t-丁基-D-丝氨酸、Fmoc-O-t-丁基-D-酪氨酸、N^q-Fmoc-正亮氨酸、Fmoc-O-t-丁基-D-丝氨酸。此时,N-末端 Fmoc 基团被去除,用 DMF 洗涤几次,再将树脂转移到 100ml 圆底烧瓶。O-叔丁基-丝氨酸 NCA (1.5g) 溶于无水 DMF 中,并加入到肽树脂中,于 40°C 摇动过夜。过滤树脂,并用 DMF 洗涤几次后放回到 CS Bio 合成仪。再使溴乙酸全部偶联到 DCM/DIC 的 N-末端丝氨酸上。当溴乙酸全部偶联到肽树脂上,(3eq)N-Boc-乙二胺加入到 NMP,并混合 2h,然后用 DMF 洗涤 3 次,再用 DCM 洗涤 3 次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的 DMF 洗涤,进而用甲醇洗涤。最后将衍生树脂空气干燥过夜。

[0203] 实施例 19

[0204] 喜树碱-羧基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-[聚-D或L-Ser]₋₁₅-D-Ser-Tyr-D-Ser-环[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-酰胺 (SEQ ID NO: 22)

[0205] 实施例 18 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中,加入含水 (2.5%)、1,2-乙二硫醇 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 5h、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA,加入乙醚到所获得的油中,得到黄色粉末,然后溶于 60%醋酸 (250mL) 中。逐滴加入甲醇中的碘浓缩液于粉末中,同时剧烈振动直到染成永久的褐色,而过量的碘通过加入少量的维生素 C 来去除。

[0206] 在真空中将溶液浓缩到约 10mL,则粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化,采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μM)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱:由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA in 80% MeCN 为缓冲液 B;以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。通过酸水解和基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

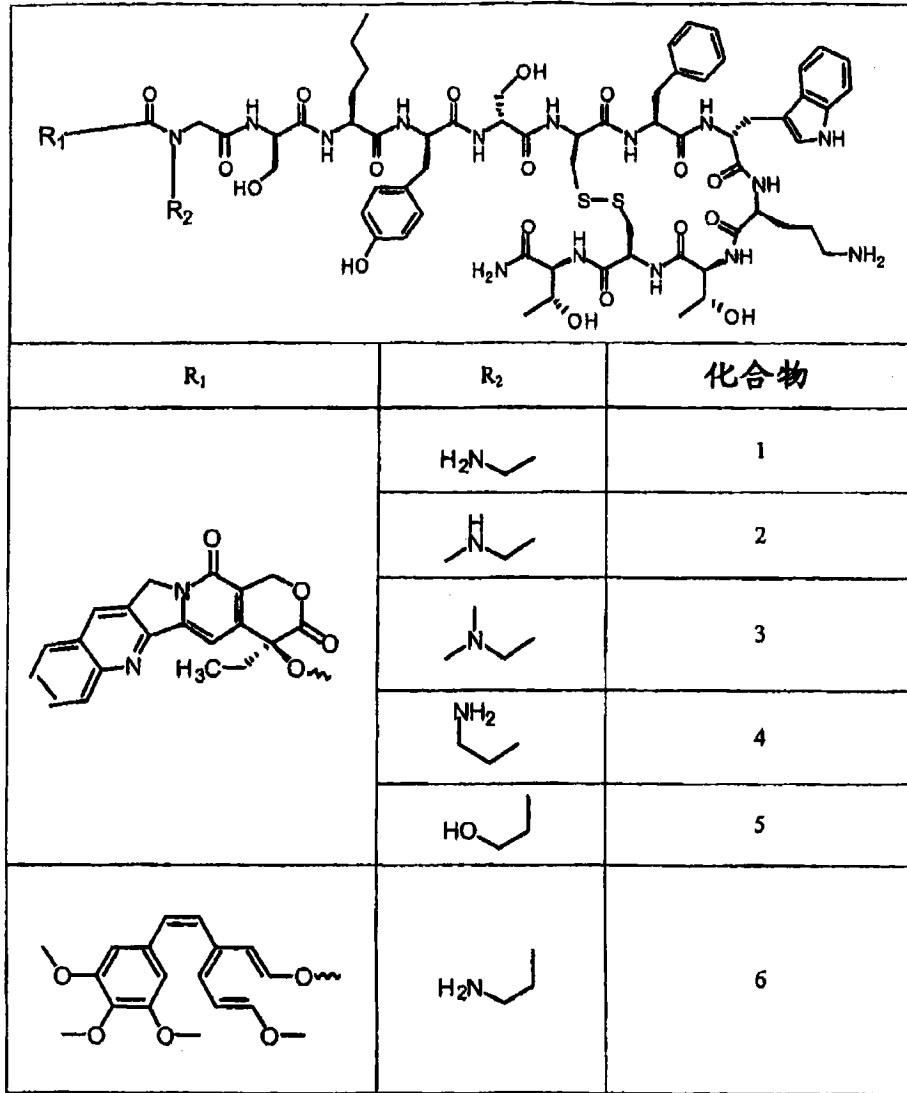
[0207] 实施例 20

[0208] 氨基甲酸偶联物在体内和体外的应用

[0209] 在体内和体外检测了具有氨基甲酸接头的偶联化合物中的细胞毒性剂的释放速率。选择氨基甲酸接头是因为相对于,如常规使用的酯类接头,它在血浆中稳定得多。也检测了包含分子内环状部分的氨基甲酸酯化合物,分子内环状部分可以调节在所连接醇基衍生物释放和环脲形成过程中达到峰值的氨基甲酸酯化合物的醇基部分的释放速率,氨基甲酸酯化合物可以用于控制合适细胞毒性剂的释放。已知氨基甲酸酯的醇部分离释的 pKa 值对于前体药物的稳定性很重要,因此我们选择两种不同化学合适的细胞毒性剂,分别包含一个具有显著不同 pKa 值的羟基基团。其中一个细胞毒性剂是拓扑异构酶 I 抑制剂,喜树碱,有环 29 位置具有一个叔羟基基团 (图 1),其 pKa 值为 18。另一细胞毒性剂是微管结合因子, combretastatin,其在芳基环上连接有一个酚式羟基基团,因而表现非常低的 pKa 值,约为 10.3。

[0210] 表 1 中的所有肽偶联物完全是在 Rink 酰胺树脂为载体,利用标准 FMOC (9- 芴基甲氧基羰基) 保护 / 去保护策略,经简单 DIC 偶联,如果 Kaiser 检测为阳性时进行 HBTU 活化作为第二步 (如上所描述的)。一旦偶联物的肽片段完成,用 DIC/DCM 将溴乙酸偶联到 N- 末端。洗涤树脂之后,5M 过量 N-BOC- 乙二胺 (或合适的保护二元胺) 的 NMP 加入其中,并混合 1h。分别地,喜树碱 (200mg ;Aldrich) 和 DMAP (400mg) 的无水 DCM (40mL) 进行混合,并冷却到 0°C。加入 20% 光气的甲苯 (600uL) 到悬浮液中,反应约 45 分钟。在溶剂蒸发后,粉末悬浮于 DCM (40mL) 中,并加入到含自由次级氨基的肽树脂中,反应过夜,继而后用 DMF、DCM 和甲醇洗涤数次。再用标准酸混合物 TFA : H₂O : EDT : TIS, 95 : 2 : 2 : 1 处理树脂 2h,以切去上面的肽。切割之后,偶联物用乙醚沉淀 4 次,溶于 60% HOAC,并用碘的甲醇溶液进行环化。然后,进行制备色谱,并用 MS 和氨基酸分析来测定其特性。所有获得的肽至少有 90% 以上的纯度,理论产量为 35%。相对于促生长素抑制素本身,偶联物亲和力的完全保持通过它们抑制促性腺激素释放激素 (GNRH) - 激发 GH 从鼠垂体细胞的单层培养物中释放的能力来体现,该检测体系已被表明与对人促生长素抑制素类型 2 受体的结合亲和力具有很好的相关性 (如参见 Raynor et al., Mol. Pharmacol. 43 :838, 1993)。表 2 中显示的偶联物的抑制能力 (IC₅₀'s) 范围在 0.26 至 0.49nM,而促生长素抑制素 -14 本身为 0.63nM。全部亲和力的保持是由于偶联物的环状促生长素抑制素部分的 N- 末端延长三肽 Nle-d-Tyr-d-Ser,它允许大基团连接而不丧失亲和力。

[0211] 表 1 :含不同 BINAR 连接基团的喜树碱和 combretastatin 偶联物。



[0212]

[0213] 表 2 : 化合物 1-6 和对照化合物的激动剂活性、细胞毒性以及缓冲液和血清中的半衰期

化合物	细胞毒性 IC ₅₀ , nM ^a IMR-32 Cells	磷酸盐缓冲液中 的半衰期(小时)	大鼠血清中的 半衰期(小时)	生长激素抑制剂 IC ₅₀ , nM ^a
1	374 ± 18	稳定 ^a	106	0.32 ± 0.02
2	54.2 ± 6	123	18	0.27 ± 0.02
3	571 ± 48	稳定	59	0.30 ± 0.04
4	>1000	稳定	72	0.26 ± 0.03
5	>1000	na	na	0.49 ± 0.1
6	2.79 ± 0.33	31	4	0.31 ± 0.1
喜树碱 Combretastatin	2.21 ± 0.44 4.36	na na	na na	na na
SRIF (1-14)	na ^b	na	2-5 分钟	0.63 ± 0.029

[0214]

[0215] a 实验进行 50h.

[0216] b 促生长素抑制素类似物对 IMR 32 细胞在高到 10⁻⁵M 的浓度下不具有毒性。

[0217] 对每一肽偶联物在磷酸缓冲液和大鼠血清中的稳定性进行了研究。类似物在 0.1M 磷酸缓冲液或新鲜大鼠血清中于 37°C 下,并在不同时间点取出部分用 HPLC 进行检测。化合物 1、3 和 4 于缓冲液中显示在实验时间内完全保持稳定 (50h ; 表 2)。化合物 2 在缓冲液稳定性较低,半衰期约 120h,而化合物 6 稳定性最差,其半衰期只有 30h。在大鼠血清中,也

明显有该趋势,但血清的分解对化合物稳定性具有明显影响。化合物 1、3 和 4 仍然是最稳定的,而化合物 2 的半衰期为 18h 以及包含酚式羟基的 combretastatin 化合物 6 稳定性最差,半衰期为 4h。

[0218] 这些偶联物的细胞毒性用标准 MTT 分析试剂盒 (Promega Corporation, Madison, WI) 进行检测。每一种化合物以相差 4 倍的不同浓度与人成神经细胞瘤细胞 IMR 32 (促生长素抑制素受体过量表达) 一起孵育 3 天,从剂量反应曲线 (图 2) 中可以得出 IC₅₀。虽然考虑在缓冲液中的稳定性之后,combretastatin- 乙二胺 BINAR 化合物 6 最具细胞毒性,但是很显然在孵育 3 天后,有 50% 该偶联物是游离细胞毒素,这是由于细胞培养基中含有某些酶地缘故。N-Me- 乙二胺喜树碱偶联物 2 是第 2 位最具毒性。孵育 3 天后,该偶联物的超过 80% 仍然保持完整。接下来最具毒性的是 1,2- 乙二胺化合物 1。该类似物显示出在磷酸缓冲液中完全稳定,但比化合物 2 的毒性低 7 倍多,比化合物 3 毒性稍强,尽管其在血清中更具稳定性。这种性质很可能是由于化合物 1 能够形成环脲而化合物 3 不能形成。

[0219] 在对肿瘤动物的初步研究中,在重复腹膜给药中,化合物 1 和 2 在肿瘤中引发细胞毒性方面似乎具有等同效果。基于 N, N- 二甲基乙二胺、二氨基丙基和 2- 羟基乙胺 BINAR 基团的化合物 (图 2 ;表 2) 基本上失活,设想可能是因为在胞内或胞外释放游离细胞毒性剂所致。喜树碱偶联物 2 在裸鼠中,以远低于单独用喜树碱最大毒性的剂量,而能够显著地使移植 NCI-H 69 小细胞肺癌 (表达 SSTR2) 的生长稳定。该资料表明不仅化学构成而且某些酶成分影响着醇基的释放。

[0220] BINAR 接头技术的价值在于能够调整不同类型含醇基团的合适的理想释放速率,并且通过简单的固相化学反应能容易整合到肽游离氨基基团上。化学方法引入基团非常适合固相合成,并能容易适合于许多不同的肽、治疗剂和细胞毒性剂。虽然该技术容易适用于 N- 末端,但也能应用于垂直 (Orthogonally) 保护侧链以更好满足保持肽结合亲和性的需要。利用本发明喜树碱偶联物,化合物 1 和 2 获得了高细胞毒性 (图 2 ;表 2),虽然它们在细胞培养基中培育条件下非常稳定。完整的肽偶联物的高浓度将特异性结合到肿瘤细胞,进而发生内化。况且,偶联物具有高度可溶性和组织清除率,并且根据上面描述,给药途径通过改变肽的亲水性来容易地进行调整。如果肽偶联物在清除过程中,保持相当程度的完整性,那么毒副作用可以大大减轻。

[0221] 实施例 21

[0222] 喜树碱 - 羰基 -N- 氨基乙基 - 丙氨酸 -S- 三苯甲基 -Cys-Rink- 酰胺 - 树脂

[0223] 将 Rink 酰胺 [4-(2',4'-二甲氧基苯基 -Fmoc-(氨甲基) 苯氧基乙酰氨基 - 正亮氨酸 - 甲基二苯甲基胺树脂 (0.063mmol), 100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS 136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中,并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂,加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂,再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后,用 DMF 洗涤树脂 4 次,因而第一保护氨基基团 :Fmoc-S- 三苯甲基 -L- 半胱氨酸 (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N- 羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF/DCM 中,并加入到树脂中混合 1 小时,继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0224] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,通过大体相同的偶联过程加入 Fmoc-N-(2-Boc- 氨基乙基) 丙氨酸 (Neosystem)。Fmoc 基团被去除,肽树脂用 DCM 洗涤数

次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的 DMF 洗涤,进而用甲醇洗涤。最后过滤后将衍生树脂空气干燥过夜。

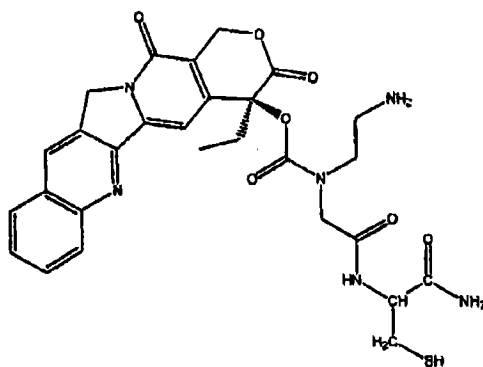
[0225] (实施例 22)

[0226] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-Cys-酰胺

[0227] 实施例 21 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中,加入含水 (2.5%)、1,2-乙二硫醇 (2.5%) 和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 5h、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA,加入乙醚到所获得的油中,得到黄色粉末,然后溶于 60%醋酸 (15mL) 中。

[0228] 粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化,采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱:由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA in 80% MeCN 为缓冲液 B;以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证,将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩,最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末,在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。如下所示,通过基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0229]



[0230] 实施例 23

[0231] 喜树碱-羰基-N-氨基乙基-丙氨酸-Phe(二二苯甲酮)-吸纳胺-树脂

[0232] 将 Rink 酰胺 [4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-(氨基)苯氧基乙酰氨基-正亮氨酸-甲基二苯基胺树脂 (0.063mmol), 100-200 目, Novabiochem, San Diego, CA) 加入到 CS136 肽自动合成仪 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) 的反应器中,并在 DMF 存在下膨胀大约 1 小时。过滤树脂,加入过量的 20% 哌啶的 DMF 溶液并混合 2min。过滤树脂,再加入过量 20% 哌啶并混合 20min 以保证去除树脂中的 Fmoc 基团。去保护之后,用 DMF 洗涤树脂 4 次,因而第一保护氨基基团:Fmoc-L-对苯甲酰基-苯基丙氨酸 (0.188mmol)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) (0.188mmol) 和 N-羟基苯并三唑一水合物 (HOBt) (0.188mmol) 全部溶解于 DMF/DCM 中,并加入到树脂中混合 1 小时,继而用 DMF 洗涤 4 次。

[0233] 再用 20% 哌啶 /DMF 溶液处理,再次去除 Fmoc 基团,通过大体相同的偶联过程加入 Fmoc-N-(2-Boc-氨基乙基)丙氨酸 (Neosystem)。Fmoc 基团被去除,肽树脂用 DCM 洗涤数次。实施例 1 制备的喜树碱氯甲酸酯加入到树脂中,混合过夜,并用大量的 DMF 洗涤,进而用甲醇洗涤。最后将衍生树脂空气干燥过夜。

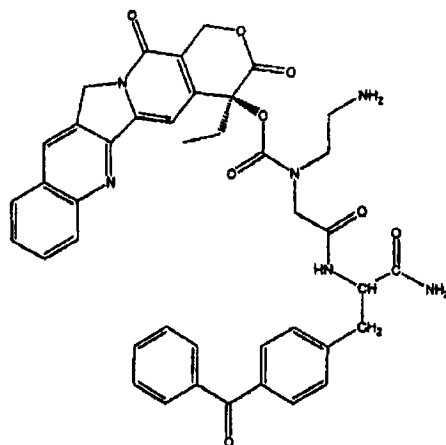
[0234] 实施例 24

[0235] 喜树碱-羰基-N-(2-氨基乙基)-丙氨酸-对苯甲酰基-苯基丙氨酸-酰胺

[0236] 实施例 23 制备的喜树碱-肽树脂 (0.063mmol) 置于圆底烧瓶中, 加入含水 (2.5%)、和三异丙基甲硅烷 (1%) 的三氟乙酸 (TFA) 溶液 15mL。搅动悬浮液 2h、过滤并用 TFA 洗涤几次。真空蒸发掉 TFA, 加入乙醚到所获得的油中, 得到黄色粉末, 然后溶于 60% 醋酸 (15mL) 中。

[0237] 粗的喜树碱-肽用制备反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化, 采用 C-18 结合的二氧化硅柱子 (21.4×250mm) (Dynamax 300, 8 μ M)。以 20mL/min 的流速进行线性梯度洗脱: 由 0.1% TFA 组成的缓冲液 A 和 0.1% TFA in 80% MeCN 为缓冲液 B; 以每分钟 1% 递增而将 B 由 20% 上升至 50%。分离液于 280nm 进行监测。用 HPLC 分析验证, 将含有纯产品的部份集中起来并在真空中浓缩, 最后进行冻干。获得的肽是绒毛似的黄色粉末, 在乙酸水溶液中冻干具有恒定的重量。如下所示, 通过基质辅助 (matrix assisted) 激光解吸质谱分析进行氨基酸分析来验证化合物。

[0238]



[0239] 其它实施方式

[0240] 虽然本发明通过优选实施方式进行了描述, 但本领域技术人员得知本发明的本质特征, 在不偏离本发明精神和范围的情况下, 可以根据不同应用和条件对本发明进行许多变化和改变。本领域技术人员可不经过多的实验, 获知本发明具体实施方式的许多等同物。这些等同物显然也包括在本发明的范围内。

[0241] 说明书中提到的所有公开出版物和专利文献引入本申请, 每一单独文献或专利文献被具体和单独地以参考文献的方式整合到本申请当中作为参考。

[0001]

序列表

<110> The Administrators of the Tulane Educational Fund et al.

<120> 治疗剂或细胞毒性剂和生物活性肽的偶联物

<130> 07005/007CN2

<150> PCT/03/06657

<151> 2003-03-03

<150> US 60/360, 831

<151> 2002-03-01

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<221> 变异体

<222> 2

<223> Xaa = N1e

<223> 合成的

<400> 1

Ser Xaa Ser Ser

1

<210> 2

<211> 4

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0002]

<400> 2
Ser Lys Ser Ser
1

<210> 3
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 3
Ser Lys Tyr Tyr
1

<210> 4
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 4
Ser Lys Tyr Ser
1

<210> 5
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 5
Ser Ser Lys Ser
1

[0003]

<210> 6
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<221> 变异体
<222> 2
<223> Xaa= Nle

<223> 合成的

<400> 6
Ser Xaa Tyr Ser
1

<210> 7
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<221> 变异体
<222> 2
<223> Xaa= pal

<223> 合成的

<400> 7
Ser Xaa Tyr Ser
1

<210> 8
<211> 4
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 8

[0004]

Ser Thr Tyr Ser

1

<210> 9

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Lys Ser Ser

1

<210> 10

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Ser Lys Ser

1

<210> 11

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<221> 变异体

<222> 1

<223> Xaa= NLE

<223> 合成的

<400> 11

Xaa Tyr Ser

[0005]

1

<210> 12

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Lys Tyr Ser

1

<210> 13

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<221> 变异体

<222> 1

<223> Xaa=Pal

<223> 合成的

<400> 13

Xaa Lys Ser

1

<210> 14

<211> 3

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Thr Tyr Ser

1

[0006]

- <210> 15
<211> 10
<212> 蛋白质
<213> 人工序列
- <220>
<221> 变异体
<222> 1
<223> Xaa= Gln, Asn, Nle, 或 Nva.
- <221> 变异体
<222> 3
<223> Xaa= Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, 或 Nva.
- <221> 变异体
<222> 4
<223> Xaa=BAIa, 4Abu, Gly, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, 或
N-Me-D-Ala.
- <221> 变异体
<222> 6
<223> Xaa= Phe, Tyr, 4-氯-Phe, 4-氟-Phe,
4-溴-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile,
Nle, 或 Nva.
- <221> 变异体
<222> 7
<223> Xaa= Met, Phe, Tyr, 4-氯-Phe, 4-氟-Phe,
4-溴-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile,
Nle, 或 Nva.
- <221> 变异体
<222> 8
<223> Xaa= 酰胺或 N-烷基酰胺
- <221> 变异体
<222> (9)... (9)
<223> Xaa 在位点 9 是 Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle,
或 Nva.
- <221> 变异体
<222> (10)... (10)

[0007]

<223> Xaa 在位点 10 是 Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, Nva, 或低级烷基酰胺.

<223> 合成的

<400> 15

Xaa Trp Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 3

<223> Xaa 在位点 3 是 Nle

<400> 16

Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 3

<223> Xaa 在位点 3 是 Nle

<221> MOD_RES

<222> 6, 11

<223> 在位点 6 和 11 的 Cys 成环状

<400> 17

[0008]

Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> 蛋白质
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<221> MOD_RES
 <222> 8
 <223> Ala 在位点 8 是 bAla

<221> 变异体
 <222> 11
 <223> Xaa 在位点 11 是 Nle

<400> 18
 Gly Ser Lys Gln Trp Ala Val Ala His Phe Xaa
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> 蛋白质
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<221> MOD_RES
 <222> 8
 <223> Ala 在位点 8 是 bAla

<221> 变异体
 <222> 11
 <223> Xaa 在位点 11 是 Nle

<400> 19
 Gly Ser Tyr Gln Trp Ala Val Ala His Phe Xaa
 1 5 10

[0009]

<210> 20

<211> 15

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

His Leu Gln Ile Gln Pro Trp Tyr Pro Gln Ile Ser Gly Lys Ser

1

5

10

15

<210> 21

<211> 13

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 4

<223> Xaa 在位点 4 是 Nle

<400> 21

Gly Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr

1

5

10

<210> 22

<211> 13

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 4

<223> Xaa 在位点 4 是 Nle

[0010]

<222> 9

<223> Xaa 在位点 9 是 Nle

<400> 27

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr
 1 5 10 15
 Cys Thr

<210> 28

<211> 19

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 10

<223> Xaa 在位点 10 是 Nle

<400> 28

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys
 1 5 10 15
 Thr Cys Thr

<210> 29

<211> 20

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

<222> 11

<223> Xaa 在位点 11 是 Nle

<400> 29

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp
 1 5 10 15

[0013]

<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<221> 变异体
<222> 14
<223> Xaa 在位点 14 是 N1e

<400> 32
Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr Ser
1 5 10 15
Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
20

<210> 33
<211> 24
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<221> 变异体
<222> 15
<223> Xaa 在位点 15 是 N1e

<400> 33
Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr
1 5 10 15
Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
20

<210> 34
<211> 25
<212> 蛋白质
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0015]

1	5	10	15
Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr			
	20	25	

<210> 37

<211> 6

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Cys Phe Trp Lys Thr Cys

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> MOD_RES

<222> 1, 6

<223> 在位点 1 和 6 的 Cys 成环状

<400> 38

Cys Phe Trp Lys Thr Cys

1 5

<210> 39

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 变异体

[0017]

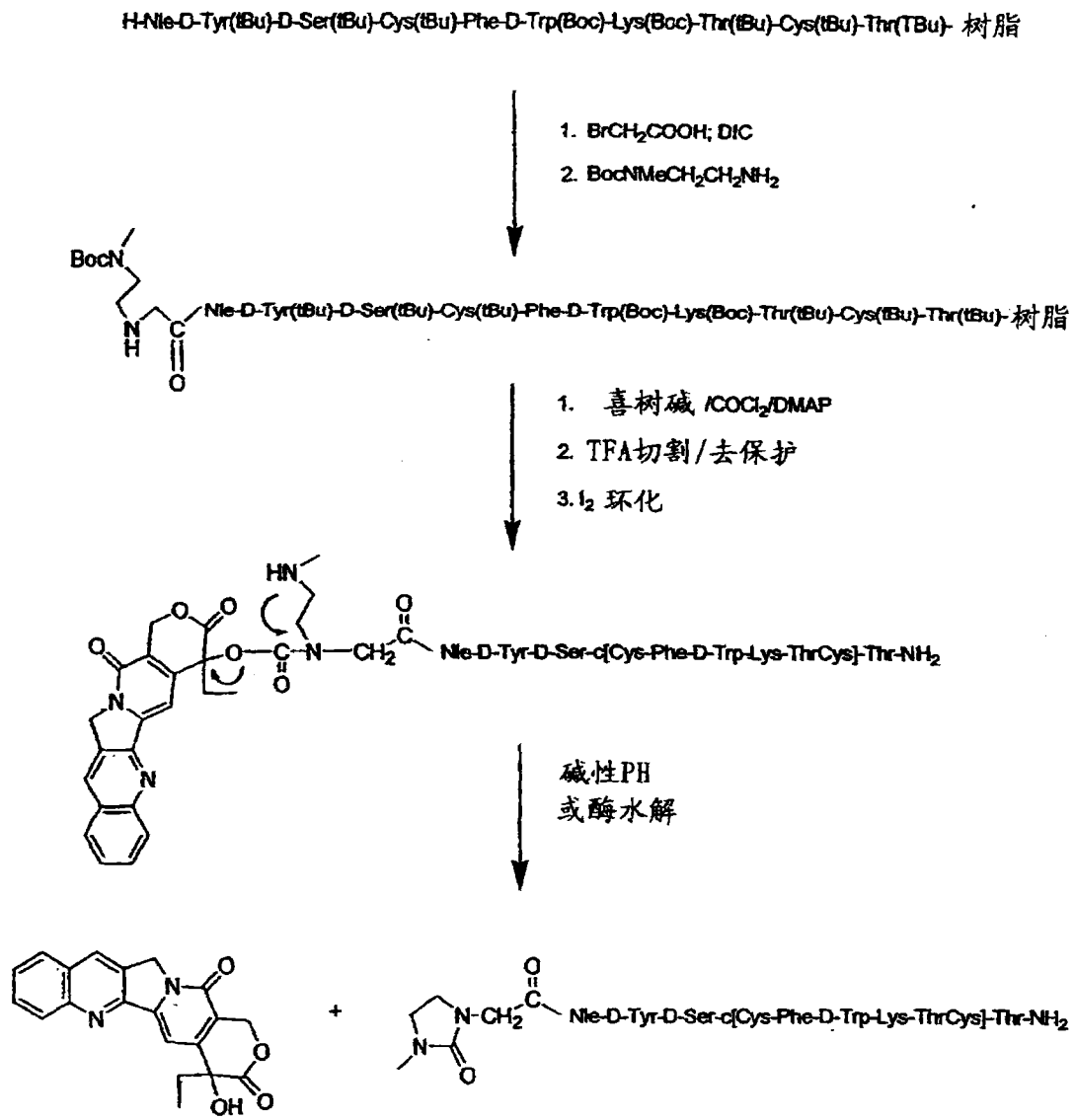


图 1

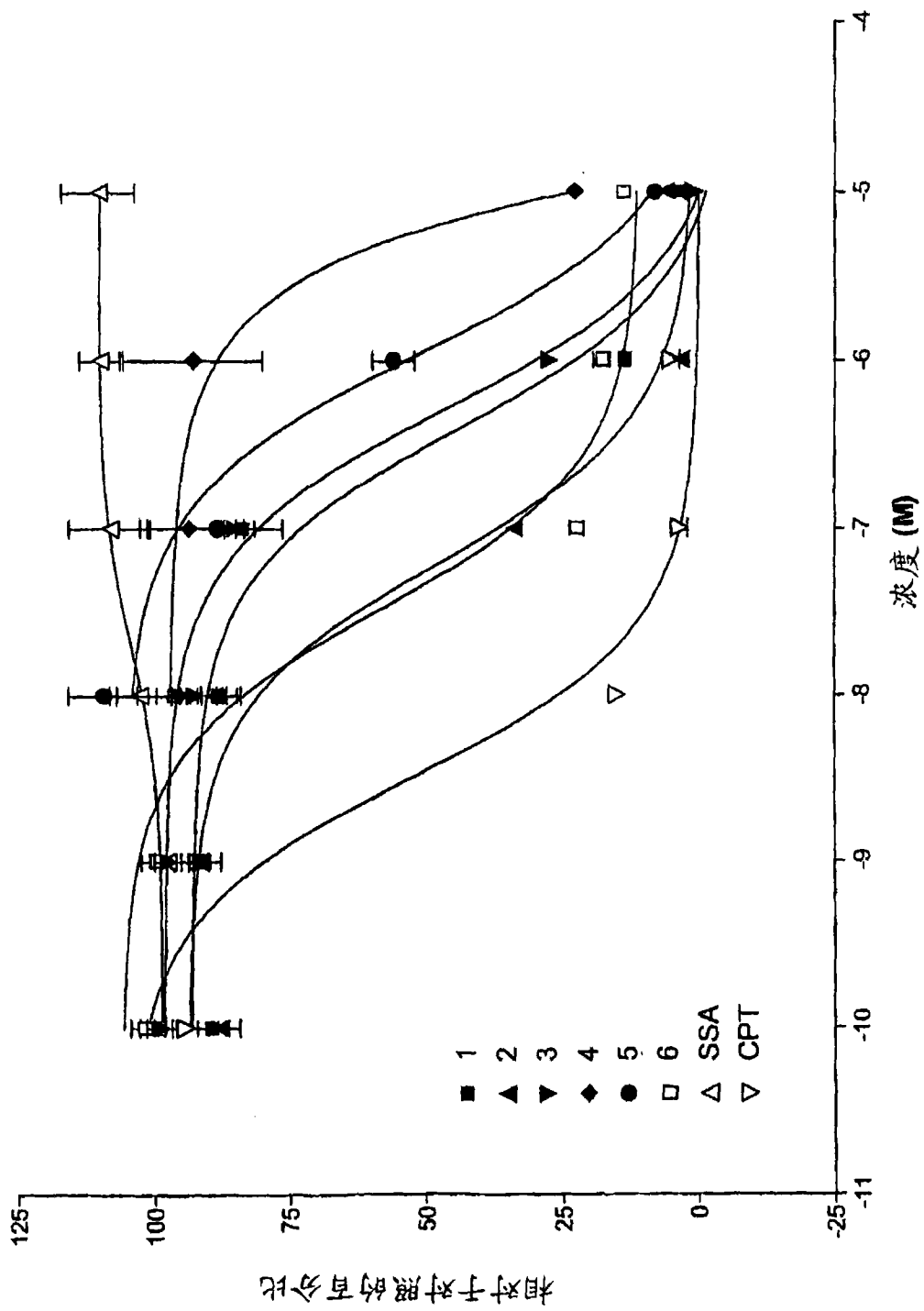


图 2